

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

ASOCIACIÓN DE LOS SNPS EN GENES RELACIONADOS AL
METABOLISMO DE LA VITAMINA D Y DE LOS NIVELES PLASMÁTICOS
DE 25- HIDROXIVITAMINA D, CON EL RIESGO DE DIABETES TIPO 2,
EN POBLACIÓN URBANA COSTARRICENSE

Tesis sometida a la consideración de la Comisión del Programa de Estudios de
Posgrado en Ciencias Biomédicas para optar al grado y título de Maestría
Académica en Ciencias Biomédicas con énfasis en Bioquímica y Fisiología

SILVIA LETICIA MONGE RODRÍGUEZ

Ciudad universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

2020

Dedicatoria

Esta tesis se la dedico a las personas que alguna vez quisieron entrar en el ejercicio de la ciencia, o que desearon ser estudiantes y luego profesores, a todas aquellas personas que aún sienten motivación por lo que hacen.

Agradecimientos

Esta tesis, supongo que como todas las tesis, ha pasado por múltiples etapas en las cuales se ha renovado de técnicas, referencias, análisis y estados emocionales. Ha necesitado el tiempo, los conocimientos y opiniones de muchísimas personas. A todas ellas, muchas gracias. Más allá de la tesis, la maestría ha representado una forma de vivir los últimos años, siempre presente y mezclada con las otras labores de la vida.

Infinitas gracias a las personas que siempre han estado en mi vida: mi mamá, mi papá, Juanma y Pablo, mi abuelita Ángela, la tía Elena, la tía Hilda, el tío Lázaro. Les agradezco que me apoyaran siempre con absolutamente todos los recursos inimaginables, con todo su esfuerzo, con todo su amor familiar, por cada día. Y a Pancho, gato esponjoso.

Quisiera agradecer a todas las personas que han sido mis profesores antes de iniciar la maestría, pues fueron quienes me motivaron a tratar de generar este proceso en mí. A la inmunología, por ser el área de mi primer *crush* al finalizar Medicina, ¡me sigue gustando mucho! En la inmunología agradezco a la Dra. Gabriela Ivankovich por ser un eslabón clínico – científico. A la Dra. Rosario Espinoza por su incomparable guía y apoyo en el inicio de la maestría.

Gracias a los Dads por ser mis amigos y amigas que me apoyaron cuando no quise concursar para residencia en el 2015, y que lo han seguido haciendo a pesar de sus ocupadas vidas. A todos los amigos de la U y de la maestría. A Nati Flores y Aisha Callebaut, a Renata, Deepak y otros caminantes. A Jenny, Martita y Cami por escucharme una y otra vez, por salir a bailar y por quererme. A Ronald Bustamante por sus sugerencias personales, musicales y literarias.

He pasado algunos años en la oficina 2-27 del Edificio de Medicina de la UCR, en esa oficina compartí con Óscar Brenes los primeros semestres laborales. A Óscar quiero agradecerle todo, especialmente su paciencia y comprensión, una persona admirable – el café le queda muy bien. En esa oficina también estuve con Shirley, Tencio, Fernando y Fofo, cada uno de ellos aportó su energía y el empujón final para concluir casi cualquier tarea. Shir, una gran científica, profesora y amiga -hasta me leía el futuro. En la oficina del frente estaba Dani Rojas, de ella recibí mucho cariño, té y plantitas. Luego llegó Lau Ríos a trabajar a fisio, Lau eternamente gracias por escucharme.

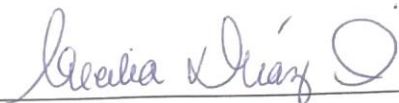
También quiero agradecer a la Dra. Adriana Suárez, Dra. Aileen Fernández, Dr. Guido Ulate del Departamento de Fisiología por apoyar el proceso desde sus puestos administrativos, docentes y su experiencia. A todos los demás profes de Fisiología, muchas gracias. Al Departamento de Bioquímica por ser mi primer trabajo, muchas personas de este departamento fueron mis profes.

A la profe Georgina Gómez, profe usted ha sido la persona que me ha dicho que sí se puede trabajar en la U, que sí se puede hacer una tesis, que sí se puede ir a una pasantía, que sí se puede buscar presupuesto, que sí podría investigar. A Rebeca Vindas por su invaluable guía, apoyo y retroalimentación durante este proceso. Al profe Warner Alpízar, gracias por su tiempo y sus correcciones.

Quisiera agradecer a la Dra. Elvira Salas, a la Dra. Marianela Vargas, a la M.Sc. Erika Méndez, a la Dra. Conny Gysemans y Dra. Chantal Mathieu por abrir las puertas de sus laboratorios o contribuir a aclarar mis dudas sobre temas específicos. También agradezco por el entrenamiento y la preparación a las personas involucradas con el INISA, con el Laboratorio Clínico de la UCR, con el Departamento de Análisis Clínico de Microbiología, con el CIPRONA de la UCR, con el Sistema de Estudios de Posgrado de la UCR, con *Clinical and Experimental Laboratory Endocrinology Laboratory*, KU Leuven.

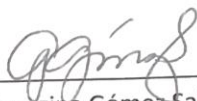
Muchas gracias. Silvia Monge.

Esta Tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Ciencias Biomédicas de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado y título de Maestría Académica en Ciencias Biomédicas Énfasis en Bioquímica y Fisiología Celular



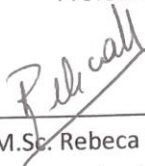
Dra. Cecilia Díaz Oreiro

Representante del Decano Sistema de Estudios de Posgrado



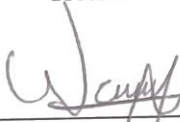
M.Sc. Georgina Gómez Salas

Profesora Guía



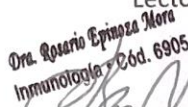
M.Sc. Rebeca Vindas Smith

Lectora



Dr. Warner Alpízar Alpízar

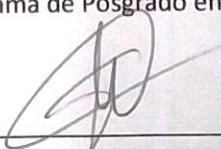
Lector



Dra. Rosario Espinoza Mora
Inmunología - Ed. 6905

Dra. Rosario Espinoza Mora

Representante Programa de Posgrado en Ciencias Biomédicas



Silvia Leticia Monge Rodríguez

Sustentante

Índice

Dedicatoria	II
Agradecimientos	III
Resumen en español	VIII
Resumen en inglés	IX
Índice de cuadros	X
Índice de figuras	XII
Abreviaturas	XIII
Introducción	XIV
Justificación	3
Marco teórico	4
Biosíntesis y mecanismo de señalización de la vitamina D	6
Parámetros de medición plasmática de la vitamina D	8
Evidencia epidemiológica de la asociación entre la deficiencia de vitamina D y DM2	9
Evidencia relacionada con la asociación entre DM2 y los niveles plasmáticos de 25- hidroxivitamina D, con los SNPs de los genes relacionados con el metabolismo de la vitamina D	12
Asociación entre deficiencia de vitamina D e hipertensión arterial (HTA)	15
Funciones de la vitamina D en el páncreas y el metabolismo de lípidos	17
Objetivos	23
Objetivo general	23
Objetivos específicos	23
Metodología	24
Muestra de estudio	24
Selección de los SNPs	25
Genotipado de SNPs	25
Cuantificación de 25-hidroxivitamina D	26
Análisis estadístico	26
Resultados	29
Análisis de normalidad de las variables	29
Características clínicas, bioquímicas y antropométricas de la muestra	29

Niveles plasmáticos de 25-hidroxivitamina D en la muestra de estudio	31
Análisis de correlación entre las variables clínicas, bioquímicas y antropométricas con el nivel plasmático de 25-hidroxivitamina D	33
Asociación de los niveles plasmáticos de 25-hidroxivitamina D con las características clínicas, bioquímicas y antropométricas.....	34
Asociación de la deficiencia, insuficiencia o suficiencia de 25-hidroxivitamina D con las características clínicas, bioquímicas y antropométricas	35
Asociación del IMC con las variables clínicas, bioquímicas y antropométricas	36
Asociación de la DM2 con las variables clínicas, bioquímicas y antropométricas	38
Frecuencias alélicas y genotípicas de los SNPs incluidos en el estudio	42
Valores promedio de 25-hidroxivitamina D plasmática según genotipo.....	44
Análisis de asociación de los SNPs con los niveles plasmáticos de 25-hidroxivitamina D	46
Análisis de asociación de los SNPs con la condición de casos y controles.....	46
Prueba de epistasis y desequilibrio de ligamiento entre los SNPs.....	48
Discusión	50
Niveles plasmáticos de 25-hidroxivitamina D y el exceso de peso	52
Vitamina D y DM2	54
Efecto biológico de los SNPs en el gen <i>GC</i> :	57
Limitaciones del estudio y recomendaciones:	60
Conclusiones	63
Referencias.....	65
Anexo 1. Aprobación del Comité Ético Científico de la Universidad de Costa Rica	78
Anexo 2. Genotipado de SNPs- Diferenciación alélicas- qPCR TaqMan.....	79
Anexo 3. Evaluación de la distribución Gaussiana de las variables continuas del estudio.....	81
Anexo 4. Estadísticos descriptivos de las variables triglicéridos, colesterol total e IMC según deficiencia, insuficiencia y suficiencia de 25-hidroxivitamina D	82
Anexo 5. Estadísticos descriptivos de las variables no alélicas ni genómicas de los controles y los casos.....	83
Anexo 6. Síntesis de 2-nitrosopiridina – necesario para la preparación de las muestras y la medición de vitamina D según el protocolo de Wan <i>et al</i> (136)	84
Anexo 7. Mediciones repetidas de 25-hidroxivitamina D.....	88
Anexo 8. Comandos empleados en PLINK 1.9.....	89

Resumen en español

Objetivo: Analizar la relación entre los niveles plasmáticos de 25-hidroxivitamina D y los polimorfismos de genes relacionados con el metabolismo de la vitamina D, con la diabetes tipo 2 (DM2), en una muestra de adultos habitantes de Desamparados, Costa Rica.

Metodología: Este fue un estudio observacional caso – control realizado en la Universidad de Costa Rica (UCR) que incluyó a 578 personas, de las cuales 316 fueron DM2 y 262 no diabéticas (130 con estado glicémico normal y 132 con prediabetes). Este estudio recibió aprobación del Comité Ético Científico de la UCR. Todos los participantes debían tener al menos dos parientes de dos generaciones previas nacidos en el Valle Central de Costa Rica. Se realizó un análisis de asociación por medio de modelos de regresión en los cuales se estudió la relación de 25-hidroxivitamina D plasmático con la DM2, y de este metabolito con 9 SNPs ubicados en genes relacionados con el metabolismo de vitamina D. También se analizó la relación entre los 9 SNPs con la DM2. En los modelos se incluyeron las variables: sexo, edad, IMC, perfil de lípidos, HTA y ancestría.

La cuantificación de la 25-hidroxivitamina D plasmática se realizó por medio de electroquimioluminiscencia en el equipo ARCHITECT. La genotipificación de los SNPs rs4588 y rs7041 del gen GC por medio de PCR en Tiempo Real con sondas TaqMan. El análisis estadístico se realizó con los programas PLINK 1.9 y IBM SPSS 22.

Resultados: La mayoría de las personas presentaron niveles plasmáticos de 25-hidroxivitamina D en rangos de deficiencia o insuficiencia. Los niveles plasmáticos promedio de 25-hidroxivitamina fueron menores en las personas con DM2 ($23,22 \pm 8,05$ ng/mL) que en aquellas sin DM2 ($25,98 \pm 7,51$ ng/mL) ($p < 0,0001$). La 25-hidroxivitamina D plasmática podría asociarse con el riesgo de DM2 ($p = 0,058$). El rs4588 y rs3755967 del gen GC se asociaron en forma negativa con los niveles plasmáticos de 25-hidroxivitamina D. No hubo asociación entre los 9 SNPs y el riesgo de DM2.

Conclusión: Los niveles bajos de 25-hidroxivitamina D plasmática se asocian con un mayor IMC y podrían aumentar el riesgo de DM2 en la población estudiada, sin embargo, su efecto es menor que el de factores de riesgo clásicos como la HTA, el sobrepeso y la obesidad. Los SNPs asociados modifican la interacción de la proteína GC con la 25-hidroxivitamina D, y de esta forma alteran la concentración total de este metabolito en plasma.

Resumen en inglés

Objective: To analyze the relationship between plasma levels of 25-hydroxyvitamin D and gene polymorphisms related to vitamin D metabolism, with type 2 diabetes (DM2), in a sample of adults living in Desamparados, Costa Rica.

Methodology: This work was an observational case - control study conducted at the University of Costa Rica (UCR). There were 578 people included, of which 316 were DM2 and 262 non-diabetic (130 with normal glycemic status and 132 with prediabetes). The study was approved by the Scientific Ethical Committee of the UCR. All participants must have at least two relatives from two previous generations born in the Central Valley of Costa Rica. The association analysis of plasmatic 25-hydroxyvitamin D with DM2 was performing with a regression model. Also, it was studied the relationship between this metabolite with 9 SNPs located in genes related to vitamin D metabolism, and these 9 SNPs with DM2. The models were adjusted by variables of sex, age, BMI, lipid profile, arterial hypertension and ancestry.

The quantification of plasma 25-hydroxyvitamin D was done with electrochemiluminescence in the ARCHITECT equipment. Genotyping of the rs4588 and rs7041 SNPs of the *GC* gene was carried out by Real-Time PCR with the use of TaqMan probes. Statistical analysis was performed with PLINK 1.9 and IBM SPSS 22 programs.

Results: It was found that most people presented plasma levels of 25-hydroxyvitamin D in deficiency or insufficiency ranges. The average plasma levels of 25-hydroxyvitamin was lower in people with DM2 ($23,22 \pm 8,05$ ng/mL) than in those without DM2 ($25,98 \pm 7,51$ ng/mL) ($p < 0,0001$). Plasma 25-hydroxyvitamin D could be associated with the risk of DM2 ($p = 0,058$). The rs4588 and rs3755967 of the *GC* gene were associated negatively with plasma levels of 25-hydroxyvitamin D. There was no association between the SNPs included in this study and the risk of DM2.

Conclusion: Low plasma 25-hydroxyvitamin D is associated with higher BMI and it could increase risk of DM2 in the studied population, however, its effect in the development of DM2 is lower than arterial hypertension, dyslipidemia or overweight. The associated SNPs modify the interaction of the *GC* protein with the 25-hydroxyvitamin D, and thus alter the total concentration of this metabolite in plasma.

Índice de cuadros

Cuadro 1. Parámetros descriptivos de las variables edad, niveles plasmáticos de 25-hidroxivitamina D, perfil de lípidos, PAS y PAD de los sujetos incluidos en el estudio.	30
Cuadro 2. Frecuencia y porcentaje de personas con deficiencia, insuficiencia y suficiencia de 25-hidroxivitamina D en los casos y controles (n=557).	32
Cuadro 3. Correlación entre los niveles plasmáticos de 25-hidroxivitamina D y las variables cuantitativas de edad, IMC, colesterol total (Col), HDL, LDL, VLDL, triglicéridos, glicemia, HbA1C, PAS y PAD.	34
Cuadro 4. Resultados del modelo de regresión lineal para los niveles plasmáticos de 25-hidroxivitamina D (n=473).	35
Cuadro 5. Resultados del modelo de regresión logística del estado de 25-hidroxivitamina D en los sujetos (n=473).	36
Cuadro 6. Resultados del modelo de regresión logística de la categoría de IMC como variable respuesta (n=529).	37
Cuadro 7. Resultados del modelo de regresión logística de los casos y los controles (n=473).	39
Cuadro 8. Resultados del modelo de regresión logística multivariante según el estado glicémico de los sujetos (n=473).	41
Cuadro 9. Frecuencias genotípicas para los SNPs incluidos en el estudio.	43
Cuadro 10. Frecuencia alélica de los SNPs incluidos en el estudio.	43
Cuadro 11. Cálculo del equilibrio de Hardy-Weinberg en la muestra total, casos y controles para los genotipos de los SNPs incluidos en el estudio (Alelo1= A1, alelo 2= A2).	43
Cuadro 12. Niveles plasmáticos promedio de 25-hidroxivitamina D \pm DE de los participantes (ng/mL) según el genotipo para cada SNPs incluido en el estudio.	45

Cuadro 13. Asociación del alelo MAF de los SNPs y los niveles plasmáticos de 25-hidroxivitamina D.	46
Cuadro 14. Asociación del alelo MAF de los SNPs con la condición de caso o control.	47
Cuadro 15. Análisis de asociación genotípica para los SNPS estudiados y la DM2.....	47
Cuadro 16. Análisis de epistasis, se muestra el mejor resultado de Chi cuadrado y el SNP correspondiente.....	48
Cuadro 17. Análisis de desequilibrio de ligamiento, se muestra el R^2 correspondiente al SNP A con el SNP B.	49
Cuadro 18. Estadísticos descriptivos de edad, IMC, glicemia, HbA1C, colesterol total, HDL-C, LDL-C, VLDL, triglicéridos (triglic), PAS, PAD y 25-hidroxivitamina D de todos los participantes, Resultados de la prueba de normalidad Kolmogorov-Smirnov (KS).....	81
Cuadro 19. Estadísticos descriptivos de triglicéridos, colesterol total e IMC según el estado de 25-hidroxivitamina D, Se realizó prueba ANOVA y prueba post-hoc Tukey entre los grupos, (n=535, * indica valor de $p < 0,05$).	82
Cuadro 20. Frecuencia (n), ** promedio \pm desviación estándar, *mediana y rango intercuartil de las características sexo, edad, IMC, glicemia, HbA1C, perfil lipídico, personas sin y con HTA, niveles plasmáticos de 25-hidroxivitamina D en los casos y los controles (n=578).....	83
Cuadro 21. Concentración de 25-hidroxivitamina D (ng/mL) de tres muestras de plasma luego de descongelarse por primera vez desde -80 °C (medición 1) y luego de descongelarse por segunda vez desde -80 °C 6 meses después de la medición 1 (medición 2).	88
Cuadro 22. Líneas ingresadas en el programa PLINK 1.9 para generar los datos mostrados en los cuadros de resultados	89

Índice de figuras

Figura 1. Vías de señalización celular que se ven moduladas por la 1,25-hidroxivitamina D3.	8
Figura 2. Distribución porcentual de las personas de la muestra que presentaban niveles plasmáticos de 25-hidroxivitamina D en los rangos de deficiencia, insuficiencia y suficiencia (n=557).	31
Figura 3. Distribución frecuencial de los niveles plasmáticos de 25-hidroxivitamina D (ng/mL) en los casos y en los controles (n=515).	31
Figura 4. Número de personas por grupo de deficiencia, insuficiencia y suficiencia de 25-hidroxivitamina D plasmática en los controles y casos (n=557).	32
Figura 5. Niveles plasmáticos de 25-hidroxivitamina D (ng/mL) según el estadio glicémico de las personas (n=557, ***p<0,0001).....	33
Figura 6. Probabilidad promedio \pm DE del modelo del cuadro 7 para establecer la condición de caso. (n=473, *** indica valor de p<0,0001).....	39
Figura 7. Probabilidad promedio \pm DE del modelo descrito en el Cuadro 7 para establecer la condición de caso según el estado de 25-hidroxivitamina D (n=505, *** indica valor de p<0,0001, ** p<0,001).	40
Figura 8. Probabilidad promedio \pm DE de que el modelo descrito en el Cuadro 8 establezca el estado glicémico diabético (n=499, *** indica valor de p<0,0001).....	42

Abreviaturas

ADN: ácido desoxirribonucleico.	Lys: lisina.
AMPc: AMP cíclico.	MAF: alelo de menor frecuencia.
ARN: ácido ribonucleico.	MAPK: quinasa activada por mitógeno.
Asp: aspartato.	MCP-1: proteína quimio-atrayente monocítica 1.
CaMKII: calcio-calmodulina quinasa II.	MIP-3 α : proteína inflamatoria macrofágica 3 alfa.
CTA: citosina – timina – adenina.	PAD: presión arterial diastólica.
CYP24A1: 24 hidroxilasa.	PAS: presión arterial sistólica.
CYP24B1: citocromo 24B1.	PCR: reacción en cadena de polimerasa.
CYP27A1: esteroide 27 hidroxilasa.	PI3K: fosfatidilinositol-3-quinasa.
CYP27B1: 1- α -hidroxilasa.	PKA: proteína quinasa A.
CYP2J3: citocromo p450 2J3.	PKC: proteína quinasa C.
CYP2R1: 25 hidroxilasa.	PLA2: fosfolipasa A2.
CYP3A4: citocromo p450 3A1.	PLC: fosfolipasa C.
Dbp: proteína ligadora de la vitamina D.	PPAR- α : receptor activado por el proliferador de peroxisomas alfa.
DE: desviación estándar.	SCAP: proteína activadora por clivaje de SREBP.
Dhcr7/ Nadsyn1: 7-dehidrocolesterol reductasa/NAD sintetasa 1.	SNP: polimorfismo de un solo nucleótido.
DM2: diabetes tipo 2.	SRAA: sistema renina-angiotensina-aldosterona.
GC: proteína ligadora de la vitamina D	SREBP: proteína de unión al elemento regulador de esteroides.
Glu: glutamato.	TGC: timina – guanosina – citosina.
GWAS: <i>genome-wide association study</i> .	Thr: treonina.
HbA1C: hemoglobina glicosilada.	TTC: timina – timina – citosina.
HDL: lipoproteína de alta densidad.	UCP: proteína desacopladora de la cadena mitocondrial.
HTA: hipertensión arterial.	UI: unidad internacional.
IC: intervalo de confianza.	VDR: receptor intracelular de vitamina D.
IFN- γ : interferón gamma.	VLDL: lipoproteína de muy baja densidad.
IL-1: interleuquina-1.	y CPT-1: carnitina palmitoil transferasa 1.
IL-15: interleuquina-15.	
IP-10: proteína inducida por interferón gamma 10.	
IRAS: <i>Insulin Resistance Atherosclerosis Family Study</i> .	
LDL: lipoproteína de baja densidad.	



UNIVERSIDAD DE
COSTA RICA

SEP

Sistema de
Estudios de Posgrado

Autorización para digitalización y comunicación pública de Trabajos Finales de Graduación del Sistema de Estudios de Posgrado en el Repositorio Institucional de la Universidad de Costa Rica.

Yo, Silvia Leticia Monge Rodríguez, con cédula de identidad 114550364, en mi condición de autor del TFG titulado Asociación de los SNPs en genes relacionados al metabolismo de la vitamina D y de los niveles plasmáticos de 25-hidroxivitamina D, en el riesgo de diabetes tipo 2, en población urbana costarricense.
Autorizo a la Universidad de Costa Rica para digitalizar y hacer divulgación pública de forma gratuita de dicho TFG a través del Repositorio Institucional u otro medio electrónico, para ser puesto a disposición del público según lo que establezca el Sistema de Estudios de Posgrado. SI ☒ NO ☐

*En caso de la negativa favor indicar el tiempo de restricción: _____ año (s).

Este Trabajo Final de Graduación será publicado en formato PDF, o en el formato que en el momento se establezca, de tal forma que el acceso al mismo sea libre, con el fin de permitir la consulta e impresión, pero no su modificación.

Manifiesto que mi Trabajo Final de Graduación fue debidamente subido al sistema digital Kerwá y su contenido corresponde al documento original que sirvió para la obtención de mi título, y que su información no infringe ni violenta ningún derecho a terceros. El TFG además cuenta con el visto bueno de mi Director (a) de Tesis o Tutor (a) y cumplió con lo establecido en la revisión del Formato por parte del Sistema de Estudios de Posgrado.

INFORMACIÓN DEL ESTUDIANTE:

Nombre Completo: Silvia Leticia Monge Rodríguez
Número de Carné: A93968 Número de cédula: 114550364
Correo Electrónico: silvia.monge.ro@gmail.com
Fecha: 4 Junio 2020 Número de teléfono: 84008379
Nombre del Director (a) de Tesis o Tutor (a): Georgina Gomez Salas


FIRMA ESTUDIANTE

Nota: El presente documento constituye una declaración jurada, cuyos alcances aseguran a la Universidad, que su contenido sea tomado como cierto. Su importancia radica en que permite abreviar procedimientos administrativos, y al mismo tiempo genera una responsabilidad legal para que quien declare contrario a la verdad de lo que manifiesta, puede como consecuencia, enfrentar un proceso penal por delito de perjurio, tipificado en el artículo 318 de nuestro Código Penal. Lo anterior implica que el estudiante se vea forzado a realizar su mayor esfuerzo para que no sólo incluya información veraz en la Licencia de Publicación, sino que también realice diligentemente la gestión de subir el documento correcto en la plataforma digital Kerwá.

Introducción

La vitamina D es una hormona con acciones pleiotrópicas que incluyen la regulación de la homeostasis del calcio/fósforo, aquellas relacionadas con la actividad antioxidante, el metabolismo de los lípidos y los carbohidratos, la modulación del sistema inmunológico, el desarrollo neural y un rol relacionado con la prevención del cáncer. Estas funciones son ampliamente investigadas desde distintos abordajes como por ejemplo los estudios epidemiológicos, los efectos celulares, los factores genéticos, los modelos animales y los efectos clínicos (1,2).

La relación entre la vitamina D y la diabetes tipo 2 (DM2) se estableció a partir de observaciones epidemiológicas. En estos estudios se determinó que las personas con deficiencia de vitamina D presentaban mayor riesgo de desarrollar DM2 (3,4). No obstante, esta asociación no es del todo clara puesto que investigaciones llevadas a cabo en distintos grupos poblacionales de origen caucásico, hispánico y asiático, no muestran resultados similares en todos los casos (3–7). Además, la suplementación oral con vitamina D a largo plazo puede mejorar el perfil metabólico (8), punto que también es controversial (9). Los ensayos clínicos no han demostrado que la suplementación evite que las personas prediabéticas progresen a DM2 (10–13).

Existen polimorfismos de un solo nucleótido (SNP, *single nucleotide polymorphism*) en los genes implicados en la biosíntesis o el transporte de la vitamina D que afectan los niveles plasmáticos de esta hormona. Algunos de los genes con SNPs asociados con los niveles de vitamina D son: *7-dehidrocolesterol reductasa (Dhcr7)/NAD sintetasa 1(Nadsyn1)*, *Cyp2r1*, *Cyp24b1*, *Dbp* o *Gc (Vitamin D binding protein)* y *Cyp24a1* (14–17).

En Costa Rica se reporta una prevalencia de DM2 del 12,8% según datos del año 2014 (18–20). Se han realizado estudios de caracterización de la población urbana y rural de Costa Rica en cuanto al comportamiento de los factores de riesgo clásicos para el desarrollo de enfermedades metabólicas (21–23). También se han efectuado análisis de los polimorfismos genéticos de riesgo para el desarrollo de la enfermedad en la población urbana del país (datos no publicados). No existe, sin embargo, información sobre los niveles séricos/plasmáticos de vitamina D y no se conoce si estos confieren riesgo para DM2; pero se ha determinado que el consumo de vitamina D de la población costarricense es bajo (24).

El objetivo de esta investigación es determinar si los SNPs que se han asociado en otras poblaciones con la deficiencia de 25-hidroxivitamina D o con el aumento del riesgo de DM2, se encuentran relacionados con los niveles plasmáticos de la vitamina D, y/o con la DM2 en una población urbana costarricense.

Justificación

La prevalencia de DM2 en la población de Costa Rica era de 10,8% en el 2010 y de 12,8% según datos del 2014 (19,25). Este aumento de DM2 significa una elevada carga al sistema de salud pública del país en cuanto a su prevención, diagnóstico y tratamiento. Esto ha contribuido a que en el Plan Nacional de Salud 2016-2020 se aborden los ámbitos de las prácticas saludables, la recreación y el deporte como estrategias de promoción de la salud, prevención y tratamiento de la malnutrición, DM2 y enfermedad cardiovascular (26).

La DM2 presenta una fisiopatología multifactorial (1,2), y entre los factores asociados se ha descrito la insuficiencia y deficiencia de la vitamina D (27–31), dado que los niveles plasmáticos de 25-hidroxitamina D3 se correlacionan negativamente con el riesgo de la DM2 (3–5). También, los SNPs de los genes relacionados con la vía de la vitamina D se han asociado con disminución de los niveles plasmáticos de vitamina D y con DM2 (14–17).

En la población urbana adulta costarricense se documentó una baja ingesta dietética de vitamina D (24), pero no existen datos que cuantifiquen los niveles plasmáticos de vitamina D en personas con DM2. Según la investigación bibliográfica realizada, este trabajo representa la primera medición de los niveles plasmáticos de vitamina D en dicha población, así como el primero que analizó si existe relación entre los niveles de la vitamina D y los SNPs de los genes *CYP2R1*, *GC* y *NADSYN1*, además de si estas variables se asociaban con la DM2. Los resultados de este trabajo podrían convertirse en la base para nuevas investigaciones que conlleven a una mejora en la prevención y tratamiento de la DM2 o condiciones asociadas.

En este estudio se emplearon las muestras recolectadas en el proyecto N° 742-B0-339 de la Universidad de Costa Rica “Estudio de factores genéticos de susceptibilidad a la DM2 y la obesidad en una población urbana de Costa Rica”, el cual incluye en su análisis a más de 500 personas, de tal forma que contribuye con datos que pueden ser representativos para esta población. Con esto, se amplió la información existente sobre los factores que podrían estar relacionados en el desarrollo de DM2.

Marco teórico

La DM2 es una enfermedad crónica en la que ocurre progresivamente resistencia a la acción de la insulina, agotamiento pancreático y desregulación en el metabolismo de los carbohidratos y lípidos, lo cual afecta la homeostasis y ocasiona alteraciones en la función de múltiples sistemas del organismo (32). Se considera una enfermedad compleja, pues intervienen múltiples factores de riesgo ambiental, genético y metabólico (32,33).

La población costarricense ha experimentado un aumento de la obesidad relacionado con los cambios en el estilo de vida de las últimas décadas. Esto se vincula con el crecimiento de las zonas urbanas, mayor sedentarismo y hábitos de alimentación poco saludables (23,34). Aunado al aumento de la obesidad y al incremento en la expectativa de vida de los costarricenses, también ha aumentado la prevalencia de enfermedades crónicas no transmisibles como la enfermedad cardiovascular y la DM2 (25).

Las publicaciones sobre la prevalencia o incidencia de DM2 en Costa Rica inicialmente provenían de datos regionales. En un análisis transversal en la Clínica del Guarco de Cartago se revisaron los expedientes de las personas mayores de 15 años (826 expedientes) que se realizaron una glicemia en ayunas por cualquier motivo en 1998. Se encontró que la tasa de prevalencia de DM2 ajustada por edad fue de 4,2 por cada 100 personas y la de intolerancia a la glucosa fue de 1,3 por cada 100 personas (34). La población costarricense de los EBAIS de Los Guidos 4, Los Guidos 5, Linda Vista y Río Azul en Desamparados, considerados zonas urbanomarginales (7039 personas incluidas) estudiadas en el año 2000, reportaron una incidencia acumulada de diabetes de 4,77% con un promedio anual de 1,19%, la tasa de incidencia fue de 1,62 por 100 personas-año (IC 95%: 1,38-1,86), la tasa de incidencia por 100 personas-año según sexo fue de 1,5 para las mujeres y de 1,93 para hombres, sin diferencia significativa por sexo (23).

Según el Análisis de situación de salud de Costa Rica, publicado en 2014 con datos basados en la Encuesta de Factores de Riesgo Cardiovascular del 2010, la prevalencia nacional de DM2 fue de 10,8%, siendo mayor en mujeres (11,6%) que en hombres (9,8%) (19,25). La segunda encuesta realizada en Costa Rica en el año 2014, reportó una prevalencia de DM2 diagnosticada en la población general de de 10,0%, y la prevalencia de DM2 no diagnosticada fue de 2,8%. En el sexo femenino la prevalencia de diabetes diagnosticada fue de 11,6% y en el sexo masculino de 8,4% con

incrementos según grupo de edad para ambos sexos. La diabetes no diagnosticada presentó una prevalencia de 2,1% en el sexo masculino y de 3,3% en el sexo femenino (18). Además, la DM2 constituye la cuarta causa de muerte prematura entre las enfermedades crónicas no transmisibles (25).

El riesgo de desarrollar DM2 es mayor en personas que tienen familiares en primer grado con diagnóstico de DM2, por lo que se han identificado variantes genéticas que confieren susceptibilidad a los individuos con dicha condición (35,36). Un grupo de investigadoras e investigadores del Instituto de Investigaciones en Salud (INISA) de la Universidad de Costa Rica, con el proyecto N° 742-B0-339 titulado “Estudio de factores genéticos de susceptibilidad a la diabetes tipo 2 y la obesidad en una población urbana de Costa Rica”, evaluó la asociación de 288 SNPs con la DM2 y la obesidad, lo anterior constituye un primer esfuerzo por caracterizar la susceptibilidad genética para DM2 en una población urbana costarricense. Los resultados de esta investigación aún no se han publicado y se encuentran en fase final de análisis. Además, se ha estudiado dos SNPs del gen de la enzima convertidora de angiotensina (37); otro grupo estableció que en la población costarricense estudiada las marcas genéticas incluidas no se asociaron con la historia familiar de riesgo de enfermedad cardiovascular y DM2 (38,39).

Un factor adicional relacionado con la patogenia de la DM2 es la vitamina D. En algunos estudios, las personas con deficiencia o insuficiencia de vitamina D presentaban un riesgo aumentado de DM2 (3–5). A estas observaciones iniciales, se le añade los análisis experimentales que estudiaron las acciones pleiotrópicas de la vitamina D, en las que se evidenció que participa en los mecanismos implicados en la homeostasis de la glucosa y la sensibilidad a la insulina (27), principalmente en el páncreas (28–31), en tejido adiposo (40,41) y el efecto inmunomodulador de esta hormona (31).

No hay reportes en los que se haya estudiado los niveles sanguíneos de vitamina D en personas con DM2 en Costa Rica. Sin embargo, el Estudio Latinoamericano de Nutrición y Salud determinó que la totalidad de la población urbana entre los 15 y los 65 años de edad no logró cumplir con el consumo recomendado por el *Institute of Medicine* de los Estados Unidos, que determina una ingesta adecuada de 600 IU/día para individuos de 14 a 70 años de ambos sexos (24).

Biosíntesis y mecanismo de señalización de la vitamina D

La vitamina D es una hormona biosintetizada a partir del colesterol. La forma endógena de vitamina D es conocida como vitamina D3 o colecalciferol (1). La síntesis incluye la fotólisis del 7-dehidrocolesterol por medio de la radiación ultravioleta, proceso que ocurre en la piel ante la exposición a la radiación solar y que produce el colecalciferol (1,42). Posteriormente, se da una hidroxilación en el carbono 25, predominantemente en el hígado. Esta hidroxilación es catalizada por cuatro enzimas: CYP27A1, CYP2R1, CYP3A4 y CYP2J3 (1,43,44). De todas estas, CYP2R1 presenta una variante genética que se ha relacionado con un fenotipo similar al raquitismo (45). Además, en ratones doble *knockout* del gen *CYP2R1* se ha visto una disminución del 50% de los niveles plasmáticos de 25-hidroxivitamina D3 (46). Esta enzima presenta gran afinidad por la vitamina D3 y vitamina D2 (ergocalciferol, obtenido por medio de la dieta) y no se le ha identificado otra función biológica que no sea la del metabolismo de la vitamina D (43,44). Por lo anteriormente mencionado, CYP2R1 es la enzima mayormente relacionada con la activación de la vitamina D, pero no la única (1,43,44,46).

La segunda hidroxilación es dada por la 1- α -hidroxilasa (CYP27B1). *CYP27B1* se expresa en el epitelio del túbulo proximal en el riñón (1,47), en la placenta (48) y en el tejido adiposo (49); también se ha reportado su expresión en los macrófagos, en células tumorales y en linfocitos CD8+ (1). La regulación negativa de esta enzima está mediada por el receptor intracelular de vitamina D (VDR), la 1,25-hidroxivitamina D3, el aumento de la calcemia (1,48,50), así como por el factor de fibroblastos 23, α Klotho (51,52) y el microARN-550a (53). Por otra parte, la regulación positiva es mediada por la hormona paratiroidea, la disminución de la calcemia, la calcitonina en condiciones de normocalcemia y la prolactina (1).

La inactivación de la 25-hidroxivitamina D3 y de la 1,25-hidroxivitamina D3 ocurre por la enzima 24 hidroxilasa (CYP24A1). El gen, *CYP24A1*, que codifica para esta enzima, es regulado al alta por la acción de VDR (1) y su expresión se da en todas las células diana de la vitamina D (43). En general, se ha determinado que los factores que disminuyen los niveles de expresión de *CYP27B1* favorecen la transcripción del gen *CYP24A1* (1,51,53).

La proteína de unión a la vitamina D (DBP o GC, *vitamin D binding protein*) es una globulina, a la que se encuentran unidos los metabolitos de la vitamina D en el plasma, aunque la afinidad es mayor

por 25-hidroxivitamina D3 que por 1,25- hidroxivitamina D3 (54). La DBP es captada por el receptor de membrana megalina. En las células del túbulo proximal, la DBP unida a 25 hidroxivitamina D3 es endocitada y, posteriormente, se da la reacción enzimática catalizada por la 1- α -hidroxilasa (55).

La función biológica de la vitamina D es atribuida clásicamente a la 1,25-hidroxivitamina D3 (1), sin embargo, la 25-hidroxivitamina D3 también es biológicamente activa. Esta última, participa en la regulación del proceso de lipogénesis (40), además se ha visto que podría sustituir a 1,25-hidroxivitamina D3 en la supresión de la hormona paratiroidea (PTH) pero a dosis que podrían resultar tóxicas para los individuos (56).

La regulación de la expresión génica mediada por la 1,25-hidroxivitamina D3 es mediada por el VDR, el cual forma un heterodímero con el receptor de ácido retinoico (RXR) (1). Otro receptor que se ha identificado es el VDRm, el cual se localiza en la membrana plasmática (57,58) y también se le conoce con otros nombres, entre ellos Pdia3, ERp60, ERp57, Grp58, y 1,25-MARR (59). Las acciones no relacionadas con la expresión génica de la vitamina D podrían ser efectuadas por el VDR o el VDRm (59) (figura 1), e involucran diversas vías de señalización, entre ellas: fosfolipasa C (PLC), fosfolipasa A2 (PLA2), fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K), Ras y segundos mensajeros como calcio, AMP cíclico (AMPc), ácidos grasos, 3 fosfoinositides (fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato); por la activación de quinasas como la proteína quinasa A (PKA), src, quinasas activadas por mitógeno (MAP quinasas), proteína quinasa C (PKC) y calcio-calmodulina quinasa II (CaMKII); y por la modulación de la probabilidad de apertura de canales de cloruro y calcio (60).

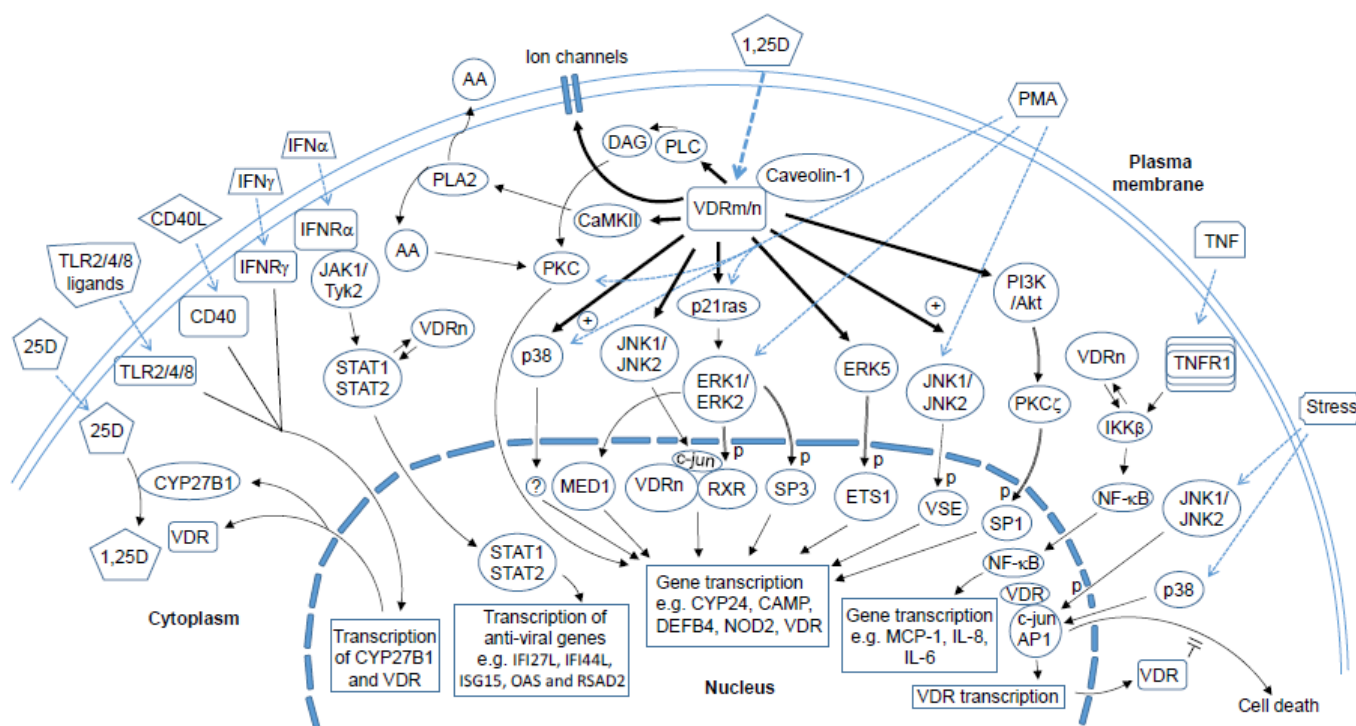


Figura 1. Vías de señalización celular que se ven moduladas por la 1,25-hidroxivitamina D3.

(60)

Parámetros de medición plasmática de la vitamina D

La Sociedad de Endocrinología, en su guía clínica, define la deficiencia de vitamina D como un valor plasmático de 25-hidroxivitamina D3 ≤ 20 ng/mL (50 nmol/L) y la insuficiencia con un valor de 25-hidroxivitamina D3 entre 21 -29 ng/mL (52,5 – 72,5 nmol/L) (61). Por su parte, los niveles plasmáticos considerados como adecuados para 1,25 hidroxivitamina D se encuentran entre 16 y 56 pg/mL, con un promedio de 37,6 pg/mL (62).

La utilización del metabolito 25-hidroxivitamina D3 y no de 1,25-hidroxivitamina D3 para asignar la condición de deficiente, insuficiente o suficiente de vitamina D, se debe a que el primero tiene una vida media de 2 – 3 semanas, mientras que el segundo metabolito de 4 – 6 horas. Los niveles de 25-hidroxivitamina D3 son 1000 veces mayores que los de 1,25-hidroxivitamina D3. Por otra parte, 25-hidroxivitamina D3 constituye el mayor reservorio de la vitamina D y sus niveles correlacionan de mejor forma con los efectos propios de la deficiencia de la hormona (63).

La 1,25-dihidroxitamina D es el metabolito que presenta mayor actividad biológica y *CYP27B1*, el gen que codifica la enzima encargada de su síntesis, tiene una mayor expresión en el epitelio tubular renal. Los pacientes con DM2 presentan alteraciones renales, en consecuencia, los niveles plasmáticos de este metabolito podrían ser menores, por lo que la suficiencia de 25-hidroxitamina D no es garantía de niveles plasmáticos de 1,25-hidroxitamina D adecuados en estos pacientes (64). En pacientes con enfermedad renal estadio 5 (específicamente en pacientes con diálisis) se concluyó que aquellos en el percentil más bajo de 1,25 hidroxitamina D presentaban mayor riesgo de muerte (65). Así como existe relación entre la nefropatía y la deficiencia de vitamina D, también se ha documentado que la nefropatía diabética es más prevalente en aquellos con deficiencia de vitamina D (66). Además, es necesario considerar que los niveles plasmáticos de los metabolitos de vitamina D no son necesariamente garantía de óptimo funcionamiento celular, ya que otros tejidos no dependen directamente de la conversión renal de vitamina D (como las células inmunes (67)) si no que se sintetiza directamente en esas células.

Evidencia epidemiológica de la asociación entre la deficiencia de vitamina D y DM2

La asociación entre el riesgo de DM2 y la deficiencia o la insuficiencia de vitamina D se ha reportado en varios estudios epidemiológicos realizados en distintas poblaciones. Dos estudios que apoyan dicha asociación son el estudio *Third National Health and Nutrition Examination Survey* NAHNES-III (3) y el *PROspective MEtabolism and ISlet cell Evaluation* PROMISE (4).

NAHNES-III es un estudio transversal efectuado en la población civil no institucionalizada de Estados Unidos realizado entre 1988-1994. En una muestra de este estudio se comparó el cuartil que presentaba mayores niveles plasmáticos de 25-dihidroxitamina D con el cuartil de menor concentración. Se incluyó a 2776 caucásicos estadounidenses, 1736 afrodescendientes estadounidenses y 1726 México-estadounidenses (todos mayores de 20 años). Se observó que la razón de probabilidades (*Odd Ratio*, OR) de ser diagnosticado con DM2 era menor conforme la concentración plasmática de 25-hidroxitamina D3 aumentaba en las personas caucásicas estadounidenses y México-estadounidenses (OR 0,25 [95% CI: 0,11– 0,60] para los caucásicos estadounidenses y OR 0,17 [95% CI: 0,08–0,37] para los México-estadounidenses). Dicha asociación no fue significativa para los afrodescendientes estadounidenses. Hubo diferencia entre las tres etnias para los niveles plasmáticos de 25-hidroxitamina D, siendo la población caucásica estadounidense la que tuvo los mayores niveles plasmáticos ($p < 0,001$) (3).

En NAHNES-III, también se identificó una relación inversa entre los niveles plasmáticos de 25-hidroxivitamina D y la glicemia en ayunas, la glicemia 2 h posterior de la ingesta de una carga oral de 75 g de glucosa, la concentración plasmática de insulina en ayunas, el índice HOMA-IR (*Homeostasis model assesment – Insulin resistance*) de resistencia a la insulina y función de la célula β en las personas México-estadounidenses ($p < 0,05$) (3). Además, otro análisis efectuado en una submuestra del estudio NAHNES-III describió la existencia de una relación inversa entre los niveles de 25-hidroxivitamina D y las cifras de presión arterial (68). También, con datos de NAHNES- III 1988 – 1994 y 2001-2006 se observó el mismo patrón con indicadores de trabajo cardíaco (69).

En el estudio PROMISE se incluyeron 712 personas caucásicas de Toronto, Londres y Ontario entre el 2004 – 2006. En el análisis de regresión univariado se observó una relación negativa entre los niveles de 25-hidroxivitamina D y la resistencia a la insulina, determinado por medio del índice de Matsuda o índice de sensibilidad a la insulina para test de tolerancia oral (ISOGTT). Los autores reportaron, además, una relación positiva entre la concentración plasmática de 25-hidroxivitamina D y la función de la célula beta pancreática. En el análisis de regresión multivariado se observó que la 25-hidroxivitamina D era un factor predictivo independiente de la sensibilidad a la insulina y la función de la célula beta. Estos resultados se obtuvieron al controlar por edad, sexo, etnia, uso de suplementos, actividad física, hormona paratiroidea e índice de masa corporal (4).

El índice de Matsuda utiliza los datos de la insulina plasmática y la glicemia en ayunas, además de la glicemia e insulina plasmática promedio de la curva de tolerancia oral con 75 g de glucosa. Con dicho índice, se obtienen valores de 1 a 12 y se plantea que a mayor índice, mayor sensibilidad a la insulina, un valor normal es ≥ 4 (70,71). El índice HOMA-IR es un modelo que cuantifica la resistencia a la insulina a partir de la concentración plasmática de la insulina o péptido C y la glicemia en ayunas. Este índice asume que la secreción de insulina de una célula beta pancreática ante la elevación de la glicemia se compromete cuando existe resistencia a la insulina, un valor normal del índice HOMA-IR es $\leq 2,5$. También, es posible calcular el HOMA-B que es el porcentaje de la función de la célula beta (71). El índice de secreción de insulina 2 se obtiene al multiplicar el área bajo la curva de insulina y el área bajo la curva de glicemia por el índice de Matsuda. El índice insulínogénico se obtiene al calcular el incremento de insulina en los primeros 30 minutos del test de tolerancia oral dividido entre el incremento de glucosa en los primeros 30 minutos (72).

También en Canadá, en una población aborigen de 390 personas mayores de 12 años, el estudio *Sandy Lake Health and Diabetes Project* (2003-2005), encontró una correlación negativa entre los niveles de 25-hidroxivitamina D y la resistencia a la insulina (HOMA-IR, $p < 0,001$). Se determinó una correlación positiva entre los niveles de 25-hidroxivitamina D y el índice de Matsuda ($p < 0,001$). Todo lo anterior después de ajustar por sexo, edad, estación del año, días de exposición al sol, PTH y el índice cintura/cadera (5).

Igualmente existen reportes en los que no se ha logrado reproducir algunas de las correlaciones mencionadas, como el estudio con personas aborígenes de Quebec, Canadá. En este estudio al ajustar por el índice de masa corporal, desaparece la correlación entre 25-hidroxivitamina D y HOMA-IR, HOMA-B y un modelo multivariante, en el cual se ajustaba por edad, sexo, actividad física, consumo de alcohol y fumado (6). En el estudio CoLaus, llevado a cabo con adultos suizos, tampoco se observó la relación negativa entre vitamina D y el riesgo de resistencia a la insulina (7).

Se debe tener en cuenta que existe un control distinto de las variables que afectan los niveles de 25-hidroxivitamina D entre los estudios, como lo son la obesidad, la actividad física, el fumado, el sexo, la edad, y la etnia, lo que agrega complejidad a los modelos de regresión y dificulta la comparación entre los estudios. Además, en dichos estudios se utilizan parámetros diferentes para determinar la función de la célula beta y la resistencia a la insulina. Estos aspectos podrían contribuir a que se encuentre menor o mayor correlación con el riesgo de desarrollar DM2. No obstante, la evidencia experimental ha venido a respaldar las asociaciones epidemiológicas y han propuesto mecanismos celulares que orientan sobre cómo la deficiencia de vitamina D favorece la aparición de la DM2 (2,27–29).

Aunque los estudios de suplementación con vitamina D también presentan resultados controversiales, la suplementación a largo plazo con dosis de 50000 IU de 25-hidroxivitamina D, parece mejorar el perfil metabólico y reducir el riesgo de desarrollar DM2. Un ensayo clínico aleatorio, doble ciego y controlado con placebo suplementó un grupo de pacientes que presentaban sobrepeso, DM2 e hipovitaminosis D (25-hidroxivitamina D ≤ 20 ng/mL) con 50000 IU de 25-hidroxivitamina D o placebo cada 2 semanas durante seis meses. Se cuantificó la ingesta energética y la actividad física de los individuos. Después de 6 meses de intervención, el grupo suplementado con vitamina D mostró una disminución de la glicemia en ayunas, menores niveles plasmáticos de

insulina, menor resistencia a la insulina (HOMA- IR y HOMA-B), menores niveles de proteína C reactiva ultrasensible, más óxido nítrico y glutatión, sin cambios en el perfil de lípidos ni los niveles séricos de triacilglicéridos (8). Sin embargo, los ensayos clínicos aleatorizados y controlados con placebo en los cuales se suplementó con vitamina D no han sido exitosos en lograr que personas con prediabetes no se vuelvan diabéticas (10–13).

Evidencia relacionada con la asociación entre DM2 y los niveles plasmáticos de 25-hidroxivitamina D, con los SNPs de los genes relacionados con el metabolismo de la vitamina D

Un polimorfismo es el término que se utiliza para designar a la variación genética que surge a partir de mutaciones aleatorias y que ha alcanzado una frecuencia alélica superior al 1% en la población, de los cuales los SNPs son los más comunes. En epidemiología genética, los estudios de asociación buscan la relación entre determinados SNPs o marcadores genéticos específicos (denominados tag-SNPs) a lo largo del gen de interés o a nivel del genoma, con el rasgo bajo estudio en la población o en individuos emparentados. Si dos condiciones ocurren juntas con mayor frecuencia de lo que se esperaría por azar se dice que existe asociación entre estas. La probabilidad de presentar un determinado rasgo (como lo puede ser la DM2) atribuido a un SNP en particular, puede analizarse según alelos o según genotipos (73). Algunos de los estudios que se utilizan en epidemiología genética para determinar la asociación entre SNPs y enfermedades son los *Genome Wide Association Studies* (GWAS) y los estudios de aleatorización mendeliana (74–77).

Los GWAS analizan todo el genoma de los individuos y tienen como objetivo identificar SNPs que se presentan con mayor frecuencia en los casos (individuos fenotípicamente bien caracterizados) que en los controles, y que podrían jugar un papel en la susceptibilidad genética de una condición en particular. Sin embargo, este tipo de estudios son costosos metodológica y económicamente, ya que se requiere una muestra grande y muchos marcadores genéticos. Además, es frecuente encontrar falsos positivos y falsos negativos; los primeros se disminuyen al elevar el umbral de significancia estadística por medio de la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples, los segundos se tratan de reducir al probar el valor predictivo de los SNPs en una segunda muestra (74).

Los estudios de aleatorización mendeliana consideran que si una variante genética se asocia con un factor de riesgo de cierta enfermedad, y esta variante genética se asocia con el riesgo de tener ciertos efectos biológicos y con la aparición de un determinado rasgo de la enfermedad; entonces

existe evidencia que apoya que la variante genética se asocia de forma causal con la enfermedad. En este tipo de estudio, el genotipo de una persona sería el análogo a la asignación de un tratamiento de manera aleatoria en un ensayo clínico, ya que el genotipo de un individuo se asigna por la combinación aleatoria del genotipo de sus padres (75–77).

Los resultados de un GWAS o de un estudio de aleatorización mendeliana arrojan conclusiones sobre grupos poblacionales específicos, por lo que es necesario tomar en cuenta la ancestría de las personas que participan en dichos estudios. En cuanto a la ancestría de la población costarricense, se ha observado por medio de análisis de microsatélites que en el Valle central de Costa Rica la ancestría es 54% europea, 32% amerindia y 13% africana (contribución de África central y occidental) (78). Cuando se analiza por medio de marcadores informativos de ancestría, la composición promedio de mezcla genética de la población de todo el territorio es 49,2% europea, 37,8% amerindia y 12,9% africana, al incluir una cuarta población ancestral de origen étnico chino los porcentajes de ancestría se modificaron a 45,6% europea, 33,5% amerindia, 11,7% africana y 9,2% china (79).

Basados en lo anterior, en este análisis se seleccionó los estudios que se realizaron en población de descendencia caucásica o amerindia, como lo son: *Insulin Resistance Atherosclerosis (IRAS) Family Study* (14,80), un GWAS publicado en el 2010 (81), el estudio TrØmso (15), un estudio danés de aleatorización mendeliana del 2014 (82), un metaanálisis de GWAS publicado en el 2010 (16) y un estudio de Ye y colaboradores publicado en el 2015 (83).

El estudio *Insulin Resistance Atherosclerosis (IRAS) Family Study* es un estudio multicéntrico y multiétnico realizado en Estados Unidos con familias de afroamericanos (513 personas de Los Ángeles, California) y de hispanos (513 personas del Valle de San Luis, Colorado y 504 personas de San Antonio, Texas) (14). En el mismo se evaluaron 30 SNPs en los genes *VDR*, *GC* y *CYP27B1*. El polimorfismo rs4588 de *GC* (CGT→CTT en la hebra de ADN 5′-3′) que resulta en un codón de cambio de aminoácido en la posición 420 treonina (Thr)→ lisina (Lys), se asoció con menores niveles de 25-hidroxivitamina D3 y 1,25 hidroxivitamina D3 en los tres grupos de poblaciones. El rs7041 en *GC* (CTC→ATC en la hebra de ADN 5′-3′) que resulta en cambio de aminoácido en la posición 416 de glutamato (Glu)→ aspartato (Asp), fue asociado con una menor concentración de 25-hidroxivitamina D3 en la población hispánica (14). Hasta el momento, en la población hispánica solo

se ha realizado un GWAS con 229 individuos en el cual se estudió la asociación de variantes genéticas con los niveles de vitamina D; sin embargo, no hubo significancia estadística cuando los resultados se aplicaron a una muestra mayor (80).

Uno de los primeros GWAS en los que se identificaron SNPs asociados con la insuficiencia de vitamina D se realizó con 16124 personas y se replicó *in silico* con 17744 personas caucásicas. Los SNPs con mayor asociación con los niveles plasmáticos de 25-hidroxivitamina D están localizados en los genes *GC*, *DHCR7/NADSYN1* y *CYP2R1*, estos fueron: rs22282679 en el gen *GC*, rs7944926 en *DHCR7/NADSYN1* y rs10741657 en *CYP2R1*. Otros SNP asociados fueron rs3755967, rs17467825, rs1155563, rs2298850 y rs7041 en *GC*; rs12785878, rs12800438, rs3794060, rs4945008, rs4944957 en el gen *DHCR7/NADSYN1*; rs2060793, rs1993116, rs12794714, rs10500804 y rs7116678 en el gen *CYP2R1* (81).

El estudio Trøndelag es un estudio poblacional longitudinal noruego enfocado en el vínculo entre los estilos de vida y las enfermedades. En la sección de DM2, se introdujo los datos de 1092 casos y 3785 controles. Este estudio se evaluó 17 SNPs asociados con los niveles plasmáticos de 25-hidroxivitamina D en reportes previos de GWAS, los genes elegidos se relacionan con la biosíntesis o acción de la vitamina D. El SNP rs2298850 del gen *GC* fue la variante más fuertemente asociada con los niveles de 25-hidroxivitamina D sérica. Sin embargo, los SNPs no alcanzaron el umbral de significancia corregido en la asociación con DM2 (15).

Un estudio de aleatorización mendeliana con participantes daneses encontró que el genotipo AA comparado con el genotipo GG para el SNP rs11234027, y el genotipo TT vrs CC para el SNP rs7944928, ambos en el gen *DHCR7*, se asociaban con menores niveles de 25-hidroxivitamina D. En el gen *CYP2R1* se reportó la misma tendencia con los genotipos GG vrs AA en el SNP rs10741657 y AA vrs GG en el SNP rs12794714. En el análisis multivariante que realizó este estudio, el *hazard ratio* (HR) ajustado para DM2 fue de 1,96 (95% IC 1,26-3,03) con concentraciones de 25-hidroxivitamina D ≤ 25 nmol/L vrs ≥ 50 nmol/L o más, HR de 6,44 (CI 5,30–7,83) para un IMC ≥ 30 kg/m² vrs IMC ≤ 25 kg/m². Este grupo no encontró asociación significativa con DM2 (82).

Un metanálisis realizado a partir de los datos de cinco GWAS, que sumaron 4501 personas, replicó los marcadores genéticos que resultaron asociados con los niveles de 25-hidroxivitamina D en tres estudios de caso-control distintos, es decir que los datos del GWAS se replicaron en 2221 individuos

(16). Este grupo probó 593253 SNPs. En el GWAS combinado, la asociación más fuerte fue para el SNP rs2282679 del gen *GC*, además los SNPs rs7041 y rs1155563 (desequilibrio de ligamiento moderado) del gen *GC* alcanzaron el umbral de significancia. Al realizar las réplicas, la asociación fue mayor con el SNP rs2282679 que para los otros dos SNPs (16).

Ye *et al* realizaron un estudio con población europea, en el cual se evaluó la asociación de los SNPs rs12785878 del gen *DHRC7*, rs10741657 del gen *CYP2R1*, rs4588 del gen *GC*, rs17217119 del gen *CYP24A1*; con la concentración plasmática de 25-hidroxivitamina D y el riesgo de DM2. Además, realizaron un estudio de aleatorización mendeliana para estimar la asociación entre 25-hidroxivitamina D y la glicemia en ayunas, glicemia 2 horas posprandial y hemoglobina glicosilada (HbA1C). Por último, este grupo efectuó un metanálisis de los estudios prospectivos que trabajaron la asociación entre vitamina D con DM2. Los cuatro SNPs se asociaron con menores concentraciones plasmáticas de 25-hidroxivitamina D, siendo el SNP rs4588 del gen *GC* el de mayor efecto y rs12785878 del gen *DHRC7* y rs17217119 del gen *CYP24A1*, los de menor efecto. Ningún SNP se asoció con el riesgo de DM2. Tampoco hubo asociación con DM2 en el estudio mendeliano aleatorizado ni con los rasgos de glicemia. El metanálisis mostró una razón de riesgo de 1,21 (1,16–1,27; $p=7,3 \times 10^{-19}$) con 8492 casos y 89698 controles para 25-hidroxivitamina D y DM2 (83).

A partir de los estudios anteriores, se puede inferir que las asociaciones entre SNPs de genes relacionados con el metabolismo y el transporte plasmático de la vitamina D podrían influir sobre los niveles plasmáticos de la vitamina D. Sin embargo, estos estudios no son necesariamente comparables debido a que utilizan distintas poblaciones, métodos de valoración y SNPs.

Asociación entre deficiencia de vitamina D e hipertensión arterial (HTA)

Otra de las acciones de la vitamina D, es la inhibición del sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) (84), efecto que ha sido claramente demostrado en modelos animales. Por ejemplo, el ratón *knockout* para el gen *CYP27B1* registró mayor presión arterial media cuando fue alimentado con una dieta normal que cuando se administró una dieta de rescate alta en calcio y fósforo, o una dieta suplementada con vitamina D. Este mismo modelo presentó mayores niveles en tejido cerebral de renina, angiotensina II y receptor tipo 1 de angiotensina II con la dieta normal que con la dieta de rescate. En este estudio, se observó una disminución tanto de la presión arterial media como de la actividad del SRAA central, luego de la administración en el sistema nervioso central de 1,25

hidroxivitamina D (85). Los datos anteriores concuerdan con un estudio publicado en el 2008 en este mismo modelo animal (86).

En humanos, las acciones de la vitamina D sobre el SRAA no son claras, pues existen resultados no concluyentes en cuanto a la inhibición del SRAA por la vitamina D (87–91). No obstante, se ha reportado que los pacientes con HTA presentan deficiencia de vitamina D con mayor frecuencia (92,93), aunque no siempre existe una relación inversa entre las cifras de presión arterial y los niveles de vitamina D (92). En 101 pacientes de Homburg/Saar, Alemania, quienes se iban a someter a una cirugía de denervación simpática renal debido a hipertensión refractaria al tratamiento (presión arterial sistólica > 160 mmHg con adecuada adherencia a 3 antihipertensivos) se les dio un seguimiento de 6 meses, para lo cual se establecieron dos grupos: quienes no responden al tratamiento y quienes sí lo hacen (presión arterial sistólica disminuyó en 10 mmHg o más). Se observó que los pacientes que no responden presentaban más frecuentemente insuficiencia de vitamina D ($p < 0,0013$) que aquellos que sí responden, y los niveles promedio de 25-hidroxivitamina D3 de los que responden eran mayores que los que no responden ($p < 0,008$) (93).

Otros estudios no han demostrado un efecto de la vitamina D en las cifras de presión arterial y la actividad del SRAA. Entre estos se encuentra el *Styrian Vitamin D Hypertension Trial*, un estudio de un único centro, doble ciego, aleatorizado y controlado por placebo realizado en Graz, Austria. En este estudio, se incluyeron 200 personas con hipertensión arterial y niveles plasmáticos de 25-hidroxivitamina D < 30 ng/mL, a quienes se les asignó un tratamiento de 2800 UI/día de vitamina D3 o placebo, la intervención fue de 8 semanas. El objetivo primario fue la disminución de la presión arterial sistólica determinada durante 24 horas. No hubo diferencia entre los grupos en cuanto a presión arterial sistólica (PAS) o diastólica (PAD), velocidad de la onda de pulso, del intervalo QTc; niveles plasmáticos de pro-péptido natriurético tipo B, renina, aldosterona, colesterol HDL ni concentración de albúmina en orina de 24 horas. Esta intervención no mostró beneficio clínico en utilizar vitamina D, sin embargo los autores añadieron que los pacientes utilizaban antagonistas del SRAA (87). Otro estudio con dosis de 300000 IU de vitamina D administradas en una sola toma, o con la misma dosis administrada durante 8 semanas, no mostró disminución de los niveles de renina, aldosterona o la actividad plasmática de renina (88). Una revisión sistemática de 46 ensayos clínicos y un metanálisis que incluyó 27 ensayos clínicos anteriores al 2014 y un total de 3092 pacientes hipertensos tampoco encontró que la suplementación con vitamina D redujera la PAS o PAD (89).

A pesar de los resultados no concluyentes de los ensayos clínicos relacionados con la suplementación de vitamina D en pacientes hipertensos, se han planteado esquemas con dosis mayores. En un estudio realizado en Pisa, Italia, se incluyeron pacientes con HTA esencial que se encontraban sin tratamientos que interfirieran directamente con el SRAA (en su esquema de tratamiento solo se incluyó fármacos antagonistas de calcio y en algunos casos se agregó un bloqueador alfa adrenérgico), y que tuvieran niveles plasmáticos de 25 hidroxivitamina D < 30 ng/mL (33 pacientes) o mayores (33 pacientes). Adicionalmente, se incluyeron personas normotensas (20 sujetos control). Se administró una dosis oral de 50000 UI por semana durante 8 semanas (dosis acumulada 400000 UI, 7142 UI/día) a los pacientes con hipovitaminosis D (94).

Se encontró que los pacientes con deficiencia de vitamina D redujeron los niveles plasmáticos de renina, angiotensina II y la actividad plasmática de renina. Adicionalmente, la vasodilatación de la arteria braquial inducida por flujo o dependiente de factores endoteliales mejoró. Los resultados anteriores apoyan la noción de que la vitamina D es un inhibidor del SRAA y que, en cierto grupo de pacientes hipertensos, mejora la función endotelial (90).

Este mismo grupo de investigación realizó un estudio previo con 15 pacientes hipertensos y con deficiencia de vitamina D en el cual se utilizó una dosis semanal de 25000 UI de vitamina D/semana durante 8 semanas. Este primer estudio no incluyó grupo control pero mostró una reducción en la renina plasmática y la aldosterona (91). Los efectos reno-protectores de la vitamina D se estudian en un ensayo clínico, el IDEAL-2 (*Intervention using vitamin D for elevated urinary albumin in type 2 diabetes mellitus*), que corre desde el 2018, en el cual se utiliza un fármaco bloqueador del receptor de angiotensina II/inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina con o sin 0,25 µg/diarios de 1,25 hidroxivitamina D en pacientes con DM2 (94).

Funciones de la vitamina D en el páncreas y el metabolismo de lípidos

La vitamina D tiene funciones en la mayoría de las células. En cuanto al desarrollo de DM2 se señalan mecanismos relacionados con la disminución de la capacidad de la célula beta pancreática de secretar insulina y con la resistencia de los tejidos a la insulina (2). Por ejemplo la vitamina D aumenta la expresión del gen del receptor de insulina, pues en su promotor tiene un sitio de respuesta hormonal a la vitamina D que aumenta su transcripción (27). En modelos animales se ha identificado que la vitamina D regula cientos de genes en la célula beta pancreática (28), y que en

condiciones de deficiencia de vitamina D se altera la capacidad de esta de responder a estímulos de glucosa (29).

En cuando a los efectos globales en la transcripción, se ha evaluado el transcriptoma en las células pancreáticas del ratón C57BL/6 expuestas de manera *in vitro* a 1,25-hidroxivitamina D o al vehículo por 6 o 24 horas. Se encontraron diferencias en la expresión de 306 genes, de los cuales 220 fueron regulados al alta y 86 regulados a la baja a las 6 horas post-tratamiento, entre ellos los genes *KLOTHO*, *CYP24A* Y *CAT* (codifica para la catalasa). A las 24 horas, se encontró cambios en los perfiles de expresión de 151 genes, de los cuales aumentaron 124 y disminuyeron 27. La vitamina D indujo la expresión de genes que controlan el crecimiento, la organización del citoesqueleto, el tráfico intracelular, las uniones comunicantes, el metabolismo de lípidos y vías endocrinas que regulan la secreción de insulina, transporte y homeostasis iónica (28). Además, a la vitamina D se le ha vinculado con la regulación epigenética a través de VDR (95).

En el páncreas, la vitamina D ejerce varias acciones por las cuales se podría explicar que la deficiencia de vitamina D ocasiona alteraciones en su función. En un modelo de ratón, se realizó una mutación que producía un receptor VDR capaz de ligar 1,25-hidroxivitamina D3 pero incapaz de unirse a las regiones de ADN de respuesta hormonal, es decir funcionalmente inactivo; además, se insertó un *cassette* bacteriano *LacZ* (29,30). Estos animales recibieron una dieta de rescate rica en calcio, fósforo y lactosa con la cual se evitó el posible efecto de la hipocalcemia en la función del páncreas endocrino. Al recibir esta dieta se normalizó el peso corporal y la homeostasis de calcio y fósforo. Se observó un aumento en la expresión del gen *LacZ* en páncreas endocrino, no así en el páncreas exocrino circundante, mientras el tamaño del páncreas y la cantidad de islotes fueron normales. La expresión de insulina a nivel de ARNm se encontró disminuida, la insulina plasmática posterior a una carga oral de glucosa fue menor y hubo una disminución en la tolerancia oral de la glucosa en este grupo, comparado con los controles. Estas observaciones pudieron deberse a un efecto directo o indirecto de la pérdida de la función de la vitamina D, y mostró una posible relación entre la secreción de insulina y la vitamina D (29).

Con el objetivo de estudiar el efecto de la vitamina D en la insulinitis pancreática, ratones NOD (*non obese diabetes*, modelo animal de diabetes tipo 1) fueron tratados con 5 µg/kg de 1,25 hidroxivitamina D3 intraperitoneal cada segundo día, o con el vehículo en el grupo control, y

posteriormente se les extrajo los islotes pancreáticos a las 4, 8 y 10 semanas de edad. A las 10 semanas, se observó que el grupo que recibió vitamina D desarrolló significativamente menos insulinitis que el grupo control, lo cual también se relacionaba con niveles mayores de insulina. Se determinó que la expresión de genes proinflamatorios (*IL-1*, *IFN- γ* , *MCP-1*, *MIP-3 α*) era mayor en los ratones NOD controles que en los que recibieron vitamina D; y que este aumento se dio principalmente entre las 8 y 10 semanas, que fue el momento que presentaron realmente insulinitis. No hubo diferencia en la expresión de VDR y calbindina entre los tratados y los controles (31).

La vitamina D no ha demostrado evitar la muerte de las células beta pancreáticas, pero sí ha demostrado tener efectos protectores parciales ante la insulinitis. En un estudio *in vitro*, la línea celular de insulinoma de rata, INS-1^E, se trató con el vehículo o con la 1,25-hidroxivitamina D por 24 horas. Se observó que la combinación de IL-1 y IFN- γ indujo la muerte de estas células, no así cuando estas actúan independientemente. La administración de vitamina D3 no disminuyó la muerte de células expuestas a la combinación de citoquinas, pero alteró la expresión génica, aumentando el nivel de ARNm de IL-1 β , MCP-1, IP-10, IL-15. Además, en ratones NOD/*LtSz-scid* este mismo grupo de investigación realizó un tratamiento con vitamina D3 por 10 semanas. No hubo un efecto protector en los islotes al exponerlos a las citoquinas, pero sí un aumento en la supervivencia de las células beta al ser aisladas (31). Entonces, si bien es cierto que no puede evitar la muerte celular podría tener efectos protectores parciales.

Además, se varió la duración del tratamiento con 1,25-hidroxivitamina D en los ratones NOD: de la semana 3 – 14 (previo a la insulinitis), de la semana 14 – 20 (después de la insulinitis) o desde la semana 2 hasta la 28 (larga duración). Se observó que, en el grupo de larga duración, el tratamiento previno la diabetes ($p < 0,0001$ comparado al control), o al menos retrasó el inicio de esta. En el grupo de exposición a la semana 14 – 20 se observó un retraso en el inicio de la diabetes ($p < 0,005$), pero no hubo diferencia significativa en el desarrollo de la diabetes. Cuando se trató con vitamina D de la semana 3 – 14 hubo diferencia en el desarrollo de diabetes, pero no en el inicio de esta (31). Es decir, que el tratamiento con vitamina D tuvo un efecto modulador en la aparición de DM en estos ratones.

En cuanto a la regulación de los lípidos, se han visto efectos tanto para 1,25-hidroxivitamina D3 como para 25-hidroxivitamina D3. Una investigación que buscaba identificar sustancias endógenas

derivadas del colesterol que produjeran disminución de los niveles séricos de ácidos grasos libres, encontró que la vitamina D ocasionaba dicho efecto. La principal proteína afectada es la de unión al elemento regulador de esteroides (SREBP, *sterol regulatory element-binding protein*), la cual es regulada por la proteína activadora por clivaje de SREBP (SCAP, *SREBP-cleavage activating protein*). Cuando los niveles de esteroides se encuentran bajos, el complejo SREBP/SCAP migra del retículo endoplasmático al complejo de Golgi, donde SREBP es clivada por la proteasa (S1P, S2P, *site – 1/2 – protease*) de tal forma que se libera el extremo transcripcionalmente activo NH₂ que inducirá genes lipogénicos. El tratamiento con 25-hidroxivitamina D mostró que los niveles celulares de ácido palmítico, ácido estérico y ácido oleico eran menores, lo que es compatible con la inhibición de SREBP (40).

El tratamiento con 25-hidroxivitamina D3 ocasiona disminución de la proteína SCAP, pero no de su ARNm. La disminución de SCAP se aceleró después del bloqueo de la síntesis de proteínas con cicloheximida, lo que indica que la 25-hidroxivitamina D3 favorece la degradación de la proteína. Como control, se vio que otras proteínas del retículo endoplasmático, como calnexina y el factor de transcripción activador 6, no cambiaban sus niveles. Al utilizar MG-132, un inhibidor del proteosoma, se observó que se contrarrestaba el efecto de 25-hidroxivitamina D3 en la disminución de SCAP. Pero al inhibir el proteosoma se acumulaba un fragmento de SCAP, el cual al utilizar un inhibidor de proteasa serina desaparecía. Se determinó que el corte de este fragmento (40 KDa en el extremo C terminal de SCAP) era necesario para su posterior degradación proteosomal. Además, se observó que el efecto de la vitamina D parece ser mediado por interacción física con SCAP, y no por medio de VDR (40).

Un estudio que utilizó ratas machos Sprague-Dawley alimentadas con dieta normal, una dieta alta en grasa, o dieta alta en grasa + 1,25-hidroxivitamina D3 intraperitoneal a diferentes dosis (1, 2,5 y 5 µg/kg) cada 2 días por 8 semanas demostró un efecto protector para esteatosis hepática en el último grupo. Se observó que después de 8 semanas las ratas con dieta alta grasa tenían 10% más de peso que las ratas con dieta normal, mientras que las ratas con vitamina D redujeron su peso de forma dosis-dependiente. En las ratas con dieta alta en grasa se determinó que la razón peso del hígado/peso corporal era un 50% mayor que en las ratas con dieta normal. En las ratas que recibieron 1,25-hidroxivitamina D3 se observó una reducción de la razón peso de hígado/peso de rata de manera dosis-dependiente en comparación con las ratas que ingirieron solo la dieta alta en

grasa. Además, se observaron menores niveles séricos de triglicéridos y ácidos grasos libres en las ratas con 1,25-hidroxivitamina D₃, de manera dosis-dependiente, que en los animales con dieta alta en grasa ($p < 0,001$). No hubo diferencia entre los grupos para el colesterol total, HDL y LDL. Los niveles plasmáticos de la enzima AST en las ratas con dieta alta en grasa fueron mayores que los de las ratas con vitamina D de manera dosis dependiente. En las ratas a las que se les suministró vitamina D se observó menor acumulación de triglicéridos en hígado que las ratas con dieta alta en grasa, además de que se presentó disminución de los puntajes de esteatosis (41). Las ratas con la dieta alta en grasa mostraron mayor expresión de SREBP y los genes relacionados, efecto que fue reducido en las ratas que recibieron vitamina D₃. Las ratas con la dieta alta en grasa además tuvieron disminución de la expresión en genes relacionados con la beta-oxidación lipídica (*PPAR- α* y *CPT-1*) ($p < 0,001$ comparado con los de dieta normal). En las ratas con dosis moderada y alta de vitamina D₃ esta disminución se revirtió (41).

En adipocitos y preadipocitos humanos, obtenidos de personas sin historia de DM2, se estudió el efecto de la vitamina D sobre su desarrollo. Se determinó que los adipocitos a los que se les indujo diferenciación mostraban mayores niveles de adiponectina, menores de CYP27B1 y VDR. Además, los preadipocitos que se expusieron a 1,25-hidroxivitamina D o a 25-hidroxivitamina D expresaron *CYP24A1*, de tal forma que ambas sustancias parecen tener acciones regulatorias en estas células; en los adipocitos la expresión de *CYP24A1* fue mayor con 25-hidroxivitamina D que con 1,25-hidroxivitamina D. Este estudio muestra que la vitamina D favorece el proceso de adipogénesis (96). Además, se ha evidenciado que en ratones *knockout* para *VDR* el tejido adiposo total es menor que en los silvestres, con menores niveles plasmáticos de leptina y menor tamaño de los adipocitos blancos y cuando se someten a dietas altas en grasa el aumento del tejido adiposo es menor que en los silvestres. Los ratones *null-VDR* presentaron mayor expresión de las proteínas desacopladoras de la cadena mitocondrial (UCP) UCP1, UCP2, UCP3, al aplicar 1,25 hidroxivitamina D a los adipocitos pardos de los ratones disminuyó la expresión de las UCPs; por lo que la vitamina D podría tener un papel en la disminución del gasto energético (97). Lo anterior contrasta, sin embargo, con lo reportado en la línea celular de ratón 3T3-L1, en la cual se observó que 1,25 hidroxivitamina D inhibe la adipogénesis (98).

La evidencia experimental anteriormente presentada sugiere que la asociación epidemiológica entre la deficiencia de vitamina D₃ y el riesgo a DM2 es debido a los efectos de esta hormona en la

función pancreática, y un factor que contribuye con la resistencia a la insulina como es la desregulación del tejido adiposo.

Objetivos

Objetivo general

Analizar la relación entre los niveles plasmáticos de 25-hidroxivitamina D y los polimorfismos en genes relacionados con el metabolismo de la vitamina D, con la DM2 en una muestra de pacientes de la Clínica Marcial Fallas, Desamparados, Costa Rica para el establecimiento de un modelo predictivo de ambas variables.

Objetivos específicos

1. Determinar la concentración plasmática de 25-hidroxivitamina D en la muestra de este estudio.
2. Determinar las frecuencias alélicas y genotípicas de los SNPs: rs10741657 en el gen *CYP2R1*, rs4588, rs7041, rs3755967 en el gen *GC*, y rs3794060, rs3829251, rs4944957, rs794426, rs12800438 en el gen *NADSYN1* en la muestra de este estudio.
3. Determinar la asociación entre los niveles plasmáticos de 25-hidroxivitamina D y el estado glicémico normal, prediabético o diabético, así como con el índice de masa corporal en la muestra de este estudio.
4. Determinar la asociación de los SNPs: rs10741657 *CYP2R1*, rs4588, rs7041, rs3755967 en el gen *GC*, y rs3794060, rs3829251, rs4944957, rs794426, rs12800438 en el gen *NADSYN1* con los niveles plasmáticos de 25-hidroxivitamina D.
5. Determinar la asociación de los SNPs: rs10741657 *CYP2R1*, rs4588, rs7041, rs3755967 en el gen *GC*, y rs3794060, rs3829251, rs4944957, rs7944926, rs12800438 en el gen *NADSYN1* con la presencia de DM2.
6. Elaborar un modelo predictivo del riesgo de DM2 basado en: los niveles plasmáticos de 25-hidroxivitamina D y los SNPs asociados con los niveles plasmáticos de vitamina D y/o DM2.

Metodología

Muestra de estudio

Las muestras de plasma que se emplearon en este proyecto fueron recolectadas de personas costarricenses sin relación de parentesco conocida, habitantes del cantón de Desamparados, que fueron incluidos en el proyecto N° 742-B0-339 del Instituto en Investigaciones en Salud (INISA), Universidad de Costa Rica “Estudio de factores genéticos de susceptibilidad a la DM2 y la obesidad en una población urbana de Costa Rica”. El objetivo de dicho proyecto fue la identificación de variantes genéticas asociadas con el riesgo de presentar DM2 y obesidad.

Los participantes fueron reclutados en la Clínica Marcial Fallas, Desamparados durante el período comprendido entre 2011-2015 y se obtuvieron muestras de sangre periférica. Para el estudio se contó con el consentimiento informado de los participantes y la aprobación del Comité Ético Científico (CEC) de la Universidad de Costa Rica y del CLOBI de la Clínica Marcial Fallas. Al igual que el proyecto N° 742-B0-339, este trabajo fue valorado por el CEC-Universidad de Costa Rica y este órgano autorizó el presente estudio, según consta en el acta número VI-6467-2017 (Anexo 1).

Criterios de inclusión y de exclusión de los participantes del proyecto N° 742-B0-339:

- **Casos:** persona con diagnóstico de DM2 mayores de 20 años, tener al menos dos parientes de dos generaciones previas (padres y abuelos) nacidos en el Valle Central. Las personas que cumplían las condiciones anteriores, pero presentaban una relación de parentesco en primer grado con alguno de los participantes se excluyeron.
- **Controles:** las características de estas personas eran ser mayores de 20 años, no ser pacientes diabéticos, glucosa plasmática en ayunas < 100 mg/dL y al menos dos parientes de dos generaciones previas (padres y abuelos) nacidos en el Valle Central. Se excluyeron las personas con antecedentes familiares de DM2 hasta dos generaciones previas o antecedentes personales de DM gestacional, también aquellas con una relación de parentesco en primer grado con alguno de los participantes, con una glucosa plasmática en ayunas \geq 100 mg/dL en la muestra de sangre al inicio del estudio o que seguía un tratamiento médico con hipoglicemiantes.

Los participantes del proyecto N° 742-B0-339 fueron caracterizados mediante análisis bioquímicos de perfil de lípidos (colesterol total, LDL, HDL, VLDL y triglicéridos), glicemia en ayunas y HbA1C; y mediante pruebas antropométricas y clínicas como talla, masa corporal y presión arterial. Además, se cuenta con la caracterización alélica de los siguientes SNPs: rs10741657 *CYP2R1*, rs3755967 *GC*, y en el gen *NADSYN1* rs3755967, rs3794060, rs3829251, rs4944957, rs7944926, rs12800438.

Selección de los SNPs

Los SNPs fueron seleccionados a partir de la revisión bibliográfica que se efectuó en la base de datos *Pubmed*, se incluyeron publicaciones hasta el año 2017. Se utilizaron las palabras clave *vitamin D*, *association study*, *genetic risk*, *GWAS* en personas con DM2. Se seleccionaron aquellos estudios que fueron efectuados en población con descendencia europea o latinoamericana.

En dichos estudios se revisó si los SNPs se asociaron con deficiencia de vitamina D o DM2, se seleccionó aquellos SNPs relacionados con los genes que participan en la síntesis o transporte de la vitamina D. No se tomaron en cuenta los SNPs reportados para el VDR, debido a que se consideró que los SNPs del gen VDR podrían tener un efecto en las funciones mediadas por la proteína VDR pero sin necesariamente afectar los niveles plasmáticos de 25-hidroxivitamina D o modificar la acción hormonal de la vitamina D en otro punto. Posteriormente, se valoró si estos SNPs mostraban asociación en más de un estudio y en diferentes poblaciones. Finalmente, se seleccionó los SNPs rs4588 y rs7041 en el gen *GC* debido a que mostraron importante asociación con los niveles de 25-hidroxivitamina D3 en el único estudio que incluyó población latinoamericana (14,80), además de relacionarse en población caucásica (15,16,81–83).

La información de todos los SNPs incluidos en el estudio se presenta utilizando los nucleótidos de la hebra de ADN 5'-3' *forward* o hebra no plantilla corroborados en la base de datos de *USCS genome browser* versión Dec (2013) GRCh38/hg38, disponible en línea (<https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>), de tal forma que los resultados del trabajo y la bibliografía presenten homogeneidad.

Genotipo de SNPs

El ADN fue extraído por los investigadores del proyecto N° 742-B0-339 con el kit FlexiGene (QIAGEN) de acuerdo a las especificaciones del fabricante. La caracterización alélica de los 2 SNPs rs4588 y rs7041 se realizó por medio de PCR en Tiempo Real con sondas TaqMan en el equipo

StepOnePlus™ de Applied Biosystems, que se encuentra en el INISA, Universidad de Costa Rica. La determinación de los genotipos se hizo mediante la detección de fluorescencia con el programa de análisis de discriminación alélica del equipo (Anexo 2). Se repitió el ensayo para ambos SNPs en el 10% de las muestras con el fin de verificar la asignación de genotipos, la selección de las muestras repetidas se hizo de manera aleatoria.

Cuantificación de 25-hidroxivitamina D

Se realizó la cuantificación sérica de 25-hidroxivitamina D por medio de electroquimioluminiscencia en el equipo ARCHITECT de la marca Abbott, este se encuentra en el Laboratorio Clínico de la Universidad de Costa Rica, con sede en el Hospital del Trauma. Se utilizó el protocolo descrito por el fabricante (99).

Análisis estadístico

Los casos y controles establecidos según el proyecto N° 742-B0-339 se reclasificaron en una nueva variable de estatus glicémico, la cual se subdividió en tres categorías: normal, prediabético y diabético.

Los diabéticos se verificaron y se establecieron como “diabéticos” y “casos” si cumplían con alguna de las siguientes condiciones, las cuales se basan en la clasificación de la *American Diabetes Association* (100):

- reportar ser diabética/o tipo 2,
- glicemia en ayunas $>125\text{mg/dL}$,
- o si la $\text{HbA1C} > 6,5\%$.

Los controles se subclasificaron en personas sin alteraciones glicémicas o “normales” cuando todas las siguientes características se cumplieron:

- no reportaron ser diabéticos,
- glicemia en ayunas $<100\text{ mg/dL}$,
- $\text{HbA1C} < 5,7\%$.

Y en “prediabéticos” si se cumplía no ser diabético tipo 2 pero asociaban alguna de las dos siguientes características:

- glicemia en ayunas ≥ 100 mg/dL pero ≤ 125 mg/dL,
- HbA1C $\geq 5,7\%$ pero $\leq 6,5$ mg/dL.

Los datos de IMC (kg/m^2) se subclasificaron en bajo peso si el IMC fue menor de 18,5, como normal si el IMC era $\geq 18,5$ y ≤ 25 , sobrepeso si el IMC fue >25 y <30 , como Obesidad I si el IMC se encontraba ≥ 30 y <35 , y Obesidad II y III si el IMC era ≥ 35 . El valor de 25-hidroxivitamina D plasmático se clasificó en deficientes si era ≤ 20 ng/mL, insuficiente si se encontraba en el rango de >20 ng/mL y < 30 ng/mL, y suficientes si es ≥ 30 ng/mL (61).

El análisis inicial incluyó la comprobación de los supuestos de igualdad de varianza y distribución normal de las variables por medio de la realización de histogramas y las pruebas Kolmogorov-Smirnov en el programa GraphPad Prims 5. Se consideró un valor de $p < 0,05$ para aceptar o rechazar la hipótesis nula. El análisis de correlación, regresión lineal, regresión logística y las probabilidades esperadas se efectuó con el programa IBM SPSS 22.

Se propuso un modelo teórico en el que la edad, el sexo, los niveles plasmáticos de 25-hidroxivitamina D, el IMC, el colesterol total, HDL, LDL, VLDL, triglicéridos y presentar o no HTA eran variables predictoras de la DM2. Se realizaron pruebas de correlación entre estas variables, sin embargo, los resultados de la correlación no se utilizaron para determinar las covariables incluidas en el modelo de regresión, ya que se mantuvo el modelo de regresión logística basado en la información biológica y el posible efecto de las variables como factores de riesgo de DM2. Este modelo teórico se replicó con la variable respuesta del estado glicémico (normal, prediabético o diabético). Además, se obtuvo la probabilidad de que el modelo asignara caso o control a los sujetos, y la probabilidad de que asignara un caso si se era deficiente, insuficiente o suficiente de vitamina D.

Se analizó la relación con los niveles plasmáticos de 25-hidroxivitamina D en un modelo de regresión lineal controlado por las variables de la edad, el sexo, los niveles plasmáticos de 25-hidroxivitamina D, el IMC, el colesterol total, HDL, LDL, VLDL, triglicéridos, el estado glicémico y presentar o no HTA. Además, se realizó un análisis de regresión logística para determinar la asociación entre los niveles plasmáticos de 25-hidroxivitamina D como variable categórica (deficiencia, insuficiencia y suficiencia) en función de las variables: colesterol total, LDL, HDL, VLDL, triglicéridos, IMC, presencia o no de HTA, así como el estatus glicémico (normal, prediabético o diabético).

Se realizó una regresión logística con el fin de determinar si existía asociación entre la categoría de IMC (normal, sobrepeso, obesidad grado I, obesidad grado II y III) según las variables de edad, sexo, glicemia en ayunas, HbA1C, colesterol total, LDL, HDL, VLDL, triglicéridos, si era o no hipertenso y 25-hidroxivitamina D.

Los análisis de los datos genéticos se realizaron con el paquete bioinformático PLINK 1.9 (<http://pngu.mgh.harvard.edu/purcell/plink>). Se evaluó la calidad de los datos por medio del equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE, prueba χ^2 $p < 0.001$). Se verificó que los SNPs no mostraran desviaciones al HWE tanto en los casos como en los controles, que los polimorfismos no tuvieran una frecuencia del alelo menor (MAF) $< 5\%$ y un éxito de genotipificación $< 85\%$. Se determinó la frecuencia de los alelos y los genotipos de los SNPs tanto en los pacientes con DM2 como en los controles.

Los SNPs incluidos en el análisis fueron: rs10741657 *CYP2R1*, rs4588, rs7041, rs3755967 en el gen *GC*, y en el gen *NADSYN1* rs3794060, rs3829251, rs4944957, rs7944926, rs12800438. Los SNPs se asociaron con los niveles plasmáticos de vitamina D con una prueba de regresión logística ajustada por covariables (edad, sexo, IMC, colesterol total, LDL, HDL, VLDL, triglicéridos, HTA y ancestría). La asociación de los SNPs con la DM2 se llevó a cabo de manera individual por medio de un análisis por alelos y por genotipos con la prueba de regresión logística, se realizó un ajuste por pruebas múltiples con la corrección de Bonferroni y solo entonces se estableció un valor de $p < 0,05$ como aceptable para la probabilidad de que la asociación sea por azar.

Además, se evaluó la interacción génica entre los polimorfismos que están involucrados en la vía metabólica de la vitamina D, por medio de la herramienta epistasis de PLINK y se efectuó un análisis de desequilibrio de ligamiento. Una vez que se realizó la corrección de Bonferroni por pruebas múltiples, se utilizó un valor de $p < 0,05$ como estadísticamente significativo.

La corrección por ancestría se realizó por medio del análisis de componentes principales con el programa EIGENSOFT versión 5.0, para 96 marcadores de ancestría. La genotipificación de estos 96 marcadores y el cálculo de la ancestría se realizó como parte del proyecto 742-B0-339.

Resultados

Análisis de normalidad de las variables

Según la prueba de Kolmogorov-Smirnov las variables de edad, IMC, colesterol total, HDL, VLDL, triglicéridos, glicemia en ayunas, HbA1C, presión sistólica y diastólica no presentaron una distribución normal ($p < 0,0001$). Para los niveles plasmáticos de 25-hidroxivitamina D y LDL, la distribución fue normal (Cuadro 18 en Anexo 3).

Características clínicas, bioquímicas y antropométricas de la muestra

Se incluyeron 578 personas, 130 no presentaban prediabetes ni DM2, 132 eran prediabéticos y 316 eran diabéticos. Es decir, se contó con 316 casos y los 262 que no eran diabéticos tipo 2 se consideraron controles (Cuadro 1). El 32,35% eran de sexo masculino y el 67,65% eran de sexo femenino, la mediana de edad fue de 64 años (RI: 16 años) y 61 años (RI: 14 años) respectivamente. La cuantificación de 25-hidroxivitamina D fue exitosa en un 96% de las muestras.

El 18,90% de los sujetos participantes presentaba un IMC normal, mientras que el 77,70% de las personas se encontraba en la clasificación de sobrepeso u obesidad. También, el 72,20% eran personas con HTA. Los niveles de colesterol total (mg/dL) en los controles presentó una mediana de 211,21 mg/dL (RI: 41,21 mg/dL), y los casos de 191,90 mg/dL (37,55 mg/dL). La mediana de los niveles plasmáticos de HDL en los controles fue de 43,00 mg/dL (RI: 13,03 mg/dL) y en los casos de 36,85 mg/dL (RI: 11,60 mg/dL). El promedio del nivel en plasma de LDL en los controles fue de $134,40 \pm 36,60$ mg/dL y en los casos de $115,40 \pm 33,60$ mg/dL. La mediana de los triglicéridos fue de 156,50 mg/dL (RI: 93,75 mg/dL) en los controles y de 185,98 mg/dL (RI: 94,50 mg/dL) en los casos (Cuadro 1).

	n=578 (%)	M y RI Edad (años)	$\bar{x} \pm DE$ 25-hidroxivitamina D (ng/mL, n=557)	M y RI colesterol total (mg/dL)	M y RI HDL (mg/dL)	$\bar{x} \pm DE$ LDL (mg/dL)	M y RI VLDL (mg/dL)	M y RI Triglic (mg/dL)	M y RI PAS (mmHg)	M y RI PAD (mmHg)
Sexo										
Masculino	187 (32,35)	64 y 16,00	25,57 \pm 7,87	185 y 51	34,95 y 10,75	115,04 \pm 34,73	33,30 y 23,55	167,00 y 116,75	130 y 23,00	76 y 12,75
Femenino	391 (67,65)	61 y 14,00	23,80 \pm 7,91	202 y 52	41,90 y 12,88	128,44 \pm 36,18	33,20 y 18,25	167,00 y 90,00	133 y 27,00	74 y 13,00
IMC (Kg/m²) Datos perdidos 17 (2,90 %)										
Bajo peso	3 (0,5)	67	30,67 \pm 8,57	198,00	58,6	136,97 \pm 58,26	17,20	86,00	114	70
Normal	109 (18,9)	66 y 18,50	26,20 \pm 8,41	203,00 y 67,00	41,10 y 14,70	132,25 \pm 39,96	31,00 y 17,70	155,00 y 88,50	125 y 23,00	73 y 17,00
Sobrepeso	250 (43,30)	63 y 13,25	25,45 \pm 7,63	202,00 y 46,00	40,00 y 12,70	125,76 \pm 34,68	33,80 y 21,20	169,00 y 105,50	131 y 25,25	75 y 13,75
Obesidad I	126 (21,80)	61 y 15,00	22,44 \pm 7,41	191,00 y 57,00	37,70 y 11,75	117,44 \pm 35,76	35,00 y 18,10	175,00 y 90,50	135 y 29,00	76 y 12,00
Obesidad II y III	73 (12,60)	58 y 10,50	21,31 \pm 7,35	188,00 y 60,00	39,60 y 10,20	192,48 \pm 36,98	33,20 y 19,00	166,00 y 95,00	139 y 21,50	76 y 12,50
Estado glicémico										
Normal	130 (22,49)	59 y 15,25	27,16 \pm 7,43	206,00 y 52,00	43,30 y 12,00	133,18 \pm 49,40	29,20 y 19,80	144,00 y 98,00	124 y 19,00	73 y 13,00
Prediabético	132 (22,83)	65 y 13,00	24,78 \pm 7,43	211,00 y 51,50	42,20 y 14,45	135,64 \pm 34,84	33,60 y 19,00	168,00 y 64,81	130 y 26,00	73 y 12,25
Diabético	316 (54,57)	62 y 14,00	23,22 \pm 8,05	191,00 y 54,50	36,85 y 11,60	115,40 \pm 48,62	34,70 y 19,10	174,50 y 94,50	136 y 27,00	77 y 13,00
HTA Datos perdidos 13 (2,20 %)										
Sin HTA	157 (27,80)	60 y 15,50	25,97 \pm 7,55	206,00 y 55,00	44,00 y 13,75	135,75 \pm 38,71	29,40 \pm 19,60	146,00 y 96,00	122 y 18,50	72 y 14,00
Con HTA	408 (72,20)	63 y 15,00	23,80 \pm 7,94	193,00 y 55,00	38,40 y 11,90	119,31 \pm 34,35	34,20 \pm 18,60	171,00 y 92,00	135 y 26,00	76 y 13,00
Condición										
Control	262 (45,99)	62 y 16,00	25,98 \pm 7,51	211,21 \pm 41,21	43,00 y 13,03	134,40 \pm 36,60	31,90 y 19,00	156,50 y 93,75	126 y 21,50	73 y 12,00
Caso	316 (54,01)	62 y 14,00	23,22 \pm 8,05	191,90 \pm 37,55	36,85 y 11,60	115,40 \pm 33,60	34,70 y 19,10	185,98 y 94,50	136 y 27,00	77 y 13,00

$\bar{x} \pm DE$: Promedio \pm desviación estándar, M y RI: o mediana, y rango intercuartil.

Cuadro 1. Parámetros descriptivos de las variables edad, niveles plasmáticos de 25-hidroxivitamina D, perfil de lípidos, PAS y PAD de los sujetos incluidos en el estudio.

Niveles plasmáticos de 25-hidroxivitamina D en la muestra de estudio

Se midieron los niveles plasmáticos de 25-hidroxivitamina D en 557 participantes. El valor mínimo de vitamina D plasmática fue de 5,30 ng/mL y el valor máximo de 52,00 ng/mL, con una media de 24,52 ng/mL (Cuadro 20 en el anexo 2). La muestra presentó un 28% de personas con niveles deficientes, la mayoría (49%) se clasificó con niveles insuficientes, y solamente el 23% presentó niveles plasmáticos de 25-hidroxivitamina D superiores a los 30 ng/mL (Figura 2). Las personas con diagnóstico de DM2 presentaron un valor promedio de 25-hidroxivitamina D de $23,22 \pm 8,05$ ng/mL y los controles de $25,92 \pm 7,51$ ng/mL (estadístico $t = 3,934$, $gl = 523$, $p < 0,0001$). Las personas con DM2 presentaron una distribución de datos con menores niveles plasmáticos de 25-hidroxivitamina D que los controles (Figura 3).

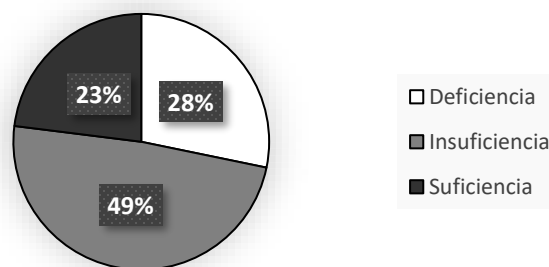


Figura 2. Distribución porcentual de las personas de la muestra que presentaban niveles plasmáticos de 25-hidroxivitamina D en los rangos de deficiencia, insuficiencia y suficiencia (n=557).

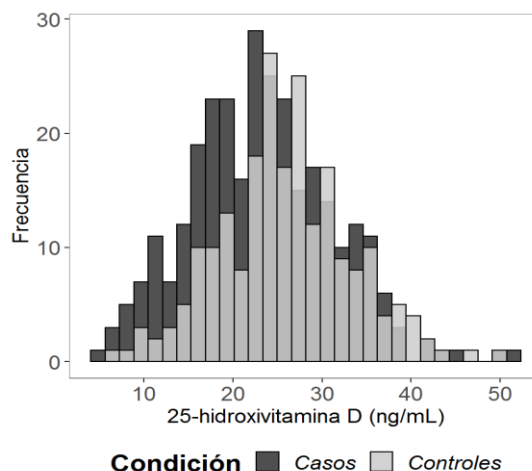


Figura 3. Distribución frecuencial de los niveles plasmáticos de 25-hidroxivitamina D (ng/mL) en los casos y en los controles (n=515).

La distribución de los niveles de vitamina D, según la clasificación de deficiencia, insuficiencia y suficiencia, fue diferente entre los controles y los casos (estadístico $\chi^2=14,36$, $gl= 2$, $p=0,0008$) como se muestra en la Figura 4. La relación entre el estado de 25-hidroxivitamina D y la condición de caso y control mostró que: la razón de deficientes versus suficientes fue 125% mayor en los casos que en los controles y la razón de insuficientes versus suficientes fue 16% mayor en los casos que en los controles (Cuadro 2).

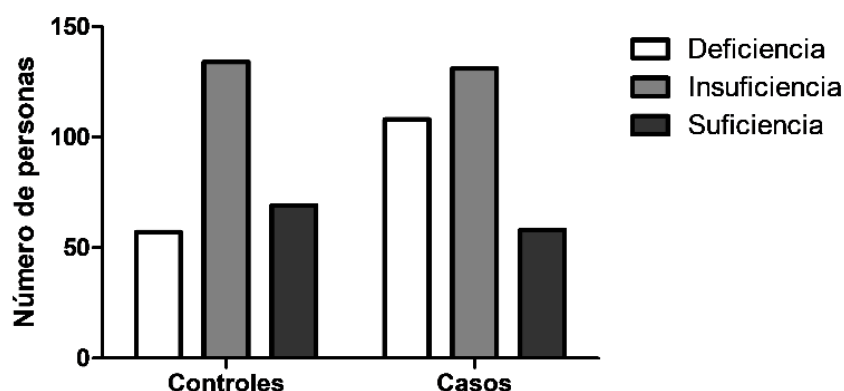


Figura 4. Número de personas por grupo de deficiencia, insuficiencia y suficiencia de 25-hidroxivitamina D plasmática en los controles y casos (n=557).

Cuadro 2. Frecuencia y porcentaje de personas con deficiencia, insuficiencia y suficiencia de 25-hidroxivitamina D en los casos y controles (n=557).

	Deficiencia	Insuficiencia	Suficiencia	Total
Casos	108 (36,36%)	131 (44,11%)	58 (19,53%,)	297
Controles	57 (21,93%)	134 (51,54%)	69 (26,54%)	260
Total	165	265	127	557
OR Deficientes versus suficientes:	2,25			
OR Insuficientes versus suficientes:	1,16			

Hubo diferencia en los niveles plasmáticos de 25-hidroxivitamina D entre los tres grupos de estadio glicémico (ANOVA de una vía, $p<0,0001$). Al emplear la prueba de comparación múltiple de Tukey se estableció que el valor promedio de 25-hidroxivitamina D fue mayor en las personas con un estado glicémico normal que en aquellas con DM2 ($p<0,0001$, IC 95%= 1,869 a 5,999). No hubo

diferencia entre el estadio glicémico normal y prediabético (IC 95% = -0,1145 - 4,895), ni entre el prediabético y diabético (IC 95% = -0,5279 - 3,6160) (figura 5).

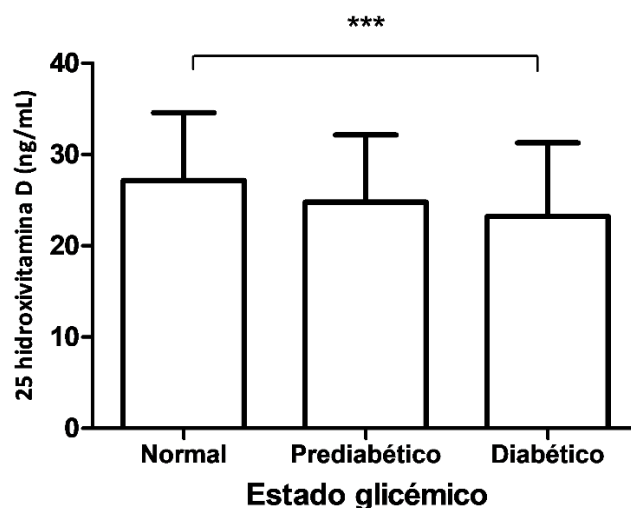


Figura 5. Niveles plasmáticos de 25-hidroxivitamina D (ng/mL) según el estadio glicémico de las personas (n=557, *** $p < 0,0001$).

En cuanto a la relación entre los niveles plasmáticos de 25-hidroxivitamina D y el IMC, se encontró que los niveles eran mayores en personas sin exceso de peso ($\text{IMC} < 25 \text{ kg/m}^2$) que en personas con exceso de peso ($\text{IMC} \geq 25 \text{ kg/m}^2$, estadístico $t = 2,5$, $gl = 538$, $p = 0,0126$). En las personas sin exceso de peso el nivel plasmático promedio \pm DE de 25-hidroxivitamina D fue de $26,20 \pm 8,28 \text{ ng/mL}$ (n=107), mientras que en las personas con exceso de peso fue de $24,08 \pm 7,73 \text{ ng/mL}$ (n=433).

Análisis de correlación entre las variables clínicas, bioquímicas y antropométricas con el nivel plasmático de 25-hidroxivitamina D

El análisis de correlación de Pearson mostró que las variables edad, IMC, triglicéridos, glicemia, HbA1C y PAS se relacionan inversamente con los niveles plasmáticos de 25-hidroxivitamina D. No hubo correlación entre los niveles de colesterol total, HDL, LDL, VLDL y PAD (Cuadro 3). Estos resultados no definieron las variables que se utilizaron para la construcción de los modelos de regresión, ya que se priorizó un modelo construido a partir de un significado biológico de las variables.

Cuadro 3. Correlación entre los niveles plasmáticos de 25-hidroxivitamina D y las variables cuantitativas de edad, IMC, colesterol total (Col), HDL, LDL, VLDL, triglicéridos, glicemia, HbA1C, PAS y PAD.

		Edad	IMC	Col	HDL	LDL	VLDL	Triglicéridos	Glicemia	HbA1C	PAS	PAD
25-hidroxivitamina D plasmática	Correlación de Pearson	-0,172**	-0,215**	-0,018	0,014	0,044	-0,060	-0,131**	-0,147**	-1,93	-0,198**	-0,044
	<i>p</i>	0,000045	4,4684E-7	0,681	0,739	0,321	0,173	0,002	0,001	0,000011	0,000003	0,310
	<i>n</i>	556	540	552	551	522	520	551	553	511	539	539

* $p < 0,05$

** $p < 0,01$

Asociación de los niveles plasmáticos de 25-hidroxivitamina D con las características clínicas, bioquímicas y antropométricas

En este modelo de regresión lineal se encontró que las variables edad, IMC y diagnóstico de DM2 se asocian con los niveles plasmáticos de 25-hidroxivitamina D, en el caso de DM2 la asociación estuvo al límite de la significancia estadística convencionalmente utilizada (Cuadro 4). Se observa una correlación negativa entre los niveles de vitamina D y estas variables. A partir de los coeficientes beta no estandarizados, se pudo determinar una tendencia que indica que por cada año que aumente la edad de la personas se reduce el nivel de 25-hidroxivitamina D en 0,198 ng/mL, por cada unidad que aumente el IMC se reducirá la concentración de 25-hidroxivitamina D en 0,382 ng/mL, y si la persona es diabética se podría reducirá en 1,5 ng/mL el valor de 25-hidroxivitamina D ($p=0,058$). Si se compara el coeficiente beta estandarizado, el cual permite comparar la magnitud del efecto de las distintas variables, se observó que el efecto de la edad y el IMC es más importante que el de ser diabético tipo 2.

Cuadro 4. Resultados del modelo de regresión lineal para los niveles plasmáticos de 25-hidroxivitamina D (n=473).

Covariable	β no estandarizado	Error	β estandarizados	t	p	IC al 95%
Constante	53,499	4,254		12,575	2,15E-31	45,138 a 61,859
Sexo (femenino)	-1,069	0,791	-0,064	-1,351	0,177	-2,624 a 0,486
Edad	-0,198	0,037	-0,252	-5,355	1,35E-7	-0,271 a -0,126
IMC	-0,382	0,075	-0,267	-5,105	4,85E-7	-0,530 a -0,235
Colesterol total	0,072	0,076	0,369	0,948	0,344	-0,078 a 0,222
Triglicéridos	-0,026	0,019	-0,246	-1,425	0,155	-0,063 a 0,010
HDL	-0,112	0,078	-0,168	-1,426	0,155	-0,265 a 0,042
LDL	-0,082	0,077	-0,382	-1,070	0,285	-0,233 a 0,69
VLDL	0,023	0,041	0,049	0,566	0,572	-0,057 a 0,104
Sin HTA	0,560	0,864	0,031	0,648	0,517	-1,137 a 2,257
Con DM2	-1,500	0,791	-0,094	-1,897	0,058	-3,055 a 0,54

Asociación de la deficiencia, insuficiencia o suficiencia de 25-hidroxivitamina D con las características clínicas, bioquímicas y antropométricas

Al realizar un modelo de regresión logística con el estado de 25-hidroxivitamina D de los sujetos con las mismas covariables que el modelo propuesto en el cuadro 4, se observó que la edad, el IMC y el estado glicémico prediabético o diabético aumentan el riesgo de presentar deficiencia de vitamina D. En este modelo, el perfil de lípidos no se asoció con el riesgo de ser deficientes de 25-hidroxivitamina D.

En cuanto a la insuficiencia de 25-hidroxivitamina D plasmática versus suficiencia, según este modelo, el IMC es un factor que aumenta el riesgo, mientras que el aumento del HDL disminuye el riesgo de ser insuficiente versus suficiente (Cuadro 5).

Cuadro 5. Resultados del modelo de regresión logística del estado de 25-hidroxivitamina D en los sujetos (n=473).

Estado de 25-hidroxivitamina D		β	Error estándar	p	OR	CI 95% para OR
Deficiencia	Intercepto	-9,742	2,017	0,000012		
	Edad	0,067	0,016	0,000022	1,070	1,037 a 1,103
	IMC	0,140	0,033	0,000024	1,150	1,078 a 1,228
	Col	-0,133	0,088	0,131	0,875	0,736 a 1,040
	Tri	0,063	0,041	0,119	1,065	0,984 a 1,153
	HDL	0,143	0,089	0,109	1,153	0,969 a 1,373
	LDL	0,137	0,089	0,120	1,147	0,965 a 1,365
	VLDL	-0,172	0,169	0,310	0,842	0,604 a 1,173
	Estado glicémico	0,411	0,208	0,048	1,509	1,004 a 2,267
	Sexo (masculino)	-0,622	0,328	0,058	0,537	0,282 a 1,021
	Sin HTA	0,050	0,363	0,890	1,051	0,516 a 2,140
Insuficiencia	Interceptación	-4,912	1,693	0,004		
	Edad	0,023	0,013	0,090	1,023	0,996 a 1,050
	IMC	0,088	0,030	0,003	1,092	1,031 a 1,157
	Col	-0,031	0,028	0,265	0,970	0,919 a 1,024
	Tri	0,005	0,009	0,566	1,005	0,987 a 1,024
	HDL	0,065	0,031	0,039	1,067	1,003 a 1,135
	LDL	0,030	0,028	0,278	1,030	0,976 a 1,088
	VLDL	0,017	0,035	0,634	1,017	0,949 a 1,090
	Estado glicémico	0,079	0,162	0,627	1,082	0,787 a 1,487
	Sexo (masculino)	-0,279	0,272	0,304	0,757	0,444 a 1,288
	Sin HTA	0,224	0,291	0,440	1,252	0,708 a 2,212

La categoría de referencia fue la suficiencia de los niveles plasmáticos de 25- hidroxivitamina D.

Asociación del IMC con las variables clínicas, bioquímicas y antropométricas

En este modelo de regresión logística se incluyó un total de 523 personas, la categoría de IMC bajo no fue incluida porque solamente 3 personas se clasificaron en ese subgrupo. La distribución de los sujetos incluidos fue la siguiente: 104 sujetos con IMC normal, 235 con sobrepeso lo que representó 44% del total de las personas incluidas en este modelo, 117 con obesidad grado I y 70 con obesidad grado II o III.

No hubo diferencia entre los coeficientes β asociados a las covariables en el grupo de sobrepeso comparado con las personas con IMC normal. Al comparar el grupo de obesidad I con el de IMC normal la HbA1C presentó una asociación positiva, mientras que la edad, el sexo masculino, la 25-hidroxivitamina D y la ausencia de HTA se asociaron de forma negativa. En el grupo de obesidad II y III versus el IMC normal: la asociación fue negativa para 25-hidroxivitamina D, ausencia de HTA, sexo masculino y para la edad, para la HbA1C la asociación fue positiva (Cuadro 6).

Cuadro 6. Resultados del modelo de regresión logística de la categoría de IMC como variable respuesta (n=529).

Grupo	Variable	β	Error estándar	p	OR	95% de IC
Sobrepeso	Intercepto	2,806	1,722	0,103		
	Edad	-0,036	0,014	0,012	0,965	0,938 a 0,992
	Colesterol total	0,032	0,039	0,413	1,032	0,957 a 1,114
	HDL	-0,031	0,040	0,437	0,969	0,896 a 1,048
	LDL	-0,038	0,039	0,335	0,963	0,892 a 1,040
	VLDL	0,027	0,040	0,488	1,028	0,951 a 1,111
	Trilgicéridos	-0,010	0,013	0,407	0,990	0,966 a 1,014
	Glicemia en ayunas	0,000	0,006	0,974	1,000	0,989 a 1,011
	HbA1C	0,278	0,178	0,118	1,320	0,932 a 1,869
	25-hidroxivitamina D	-0,018	0,018	0,307	0,982	0,948 a 1,017
	Sin HTA	-0,532	0,296	0,073	0,587	0,328 a 1,050
	Sexo (masculino)	-0,649	0,288	0,024	0,523	0,298 a 1,918
Obesidad grado I	Intercepto	6,333	2,050	0,002		
	Edad	-0,067	0,017	1,1E-4	0,936	0,904 a 0,968
	Colesterol	-0,005	0,069	0,948	0,995	0,870 a 1,139
	HDL	-0,016	0,068	0,817	0,984	0,861 a 1,125
	LDL	-0,009	0,069	0,901	0,991	0,866 a 1,135
	VLDL	0,010	0,052	0,854	1,010	0,911 a 1,119
	Triglicéridos	0,001	0,018	0,954	1,001	0,966 a 1,037
	Glicemia en ayunas	-0,005	0,006	0,394	0,995	0,983 a 1,007
	HbA1C	0,498	0,189	0,008	1,645	1,137 a 2,381
	25-hidroxivitamina D	-0,072	0,022	0,001	0,931	0,892 a 0,971
	Sin HTA	-0,763	0,370	0,039	0,466	0,226 a 0,964
	Sexo (masculino)	-1,188	0,357	0,001	0,305	0,151 a 0,613
	Intercepto	10,931	2,531	1,6E-5		

Obesidad grado II y III	Edad	-0,121	0,022	4,7E-8	0,886	0,849 a 0,926
	Colesterol	0,019	0,100	0,849	1,019	0,838 a 1,240
	HDL	-0,033	0,099	0,741	0,968	0,796 a 1,176
	LDL	-0,036	0,100	0,716	0,964	0,792 a 1,174
	VLDL	0,014	0,072	0,852	1,014	0,880 a 1,168
	Triglicéridos	-0,007	0,026	0,796	0,993	0,945 a 1,045
	Glicemia en ayunas	-0,007	0,007	0,292	0,993	0,980 a 1,006
	HbA1C	0,554	0,206	0,007	1,740	1,162 a 2,604
	25-hidroxivitamina D	-0,116	0,028	2,6E-5	0,890	0,843 a 0,940
	Sin HTA	-2,679	0,680	8,9 E-5	0,069	0,018 a 0,260
	Sexo (masculino)	-2,110	0,504	2,9 E-5	0,121	0,045 a 0,326

La categoría de referencia fue IMC normal.

Asociación de la DM2 con las variables clínicas, bioquímicas y antropométricas

La prueba de regresión logística multivariante efectuada con el modelo teórico en el cual se utilizaron las variables categóricas de sexo y presencia o no de HTA, junto con las variables cuantitativas IMC, niveles plasmáticos de 25-hidroxivitamina D, colesterol total, HDL, LDL, VLDL, triglicéridos y edad, incluyó un total de 473 sujetos. De estos, 95 se clasificaron como estadio glicémico normal, 100 como prediabéticos y 278 como diabéticos. Se obtuvo el modelo tanto en los casos y los controles (Cuadro 7), como en los grupos de estado glicémico normal, prediabético y diabético (Cuadro 8).

En el modelo del Cuadro 7, se incluyeron 195 controles y 278 casos, de los cuales 349 presentaban un diagnóstico de HTA y 319 eran de sexo femenino. En este modelo reveló asociación de la DM2 con la ausencia de HTA. Los niveles plasmáticos de 25-hidroxivitamina D mostraron una asociación al límite de la significancia estadística empleada por convención, y podrían estar asociados con la DM2 (coeficiente $\beta=-0,028$, $p=0,063$). El sexo y la edad no presentaron asociación. El IMC presentó una asociación positiva con la DM2 (coeficiente $\beta=0,136$, $p=6,07E-7$). Según las OR que se obtuvieron, la probabilidad de que el sujeto sea un caso comparado con los controles es: 2,8% menor por cada unidad (ng/mL) que aumenta la 25-hidroxivitamina D plasmática, 66,4% menor si no es hipertenso y 14,5% por cada unidad que aumente el IMC.

Cuadro 7. Resultados del modelo de regresión logística de los casos y los controles (n=473).

Variable	β	p	$\text{Exp}(\beta)=\text{OR}$	95% CI para OR
Sexo (masculino)	-0,307	0,224	0,736	0,449 a 1,206
Edad	0,016	0,203	1,016	0,992 a 1,040
IMC	0,136	6,07E-7	1,145	1,086 a 1,208
Colesterol total	0,012	0,655	1,012	0,960 a 1,067
HDL	-0,027	0,305	0,973	0,923 a 1,025
LDL	-0,023	0,388	0,977	0,926 a 1,030
VLDL	0,002	0,845	1,002	0,980 a 1,026
Triglicéridos	0,000	0,982	1,000	0,988 a 1,012
Sin HTA	-1,089	1,90E-5	0,336	0,204 a 0,554
25-hidroxivitamina D	-0,028	0,063	0,972	0,944 a 1,002
Constante	-1,730	0,294	0,177	

La categoría de referencia fueron los controles

La probabilidad promedio a partir del modelo del Cuadro 7 para que un sujeto sea asignado como diabético en el grupo control es $0,4395 \pm 0,2335$ y para los casos es $0,6917 \pm 0,2036$ (Figura 6). La prueba T indicó diferencia entre ambos grupos ($p < 0,0001$).

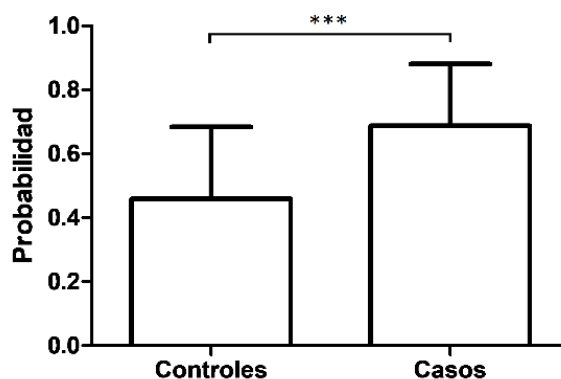


Figura 6. Probabilidad promedio \pm DE del modelo del cuadro 7 para establecer la condición de caso. (n=473, *** indica valor de $p < 0,0001$).

La probabilidad promedio de que el modelo del Cuadro 7 asigne un caso es $0,7028 \pm 0,2158$ si pertenece al grupo de deficientes de vitamina D, $0,5616 \pm 0,2416$ si es insuficiente y $0,4736 \pm 0,2463$ si es suficiente en los niveles de vitamina D (Figura 7). La prueba ANOVA de una vía indicó que hay diferencias en la probabilidad promedio entre grupos ($p < 0,0001$), la prueba Tukey identificó diferencias entre todos los grupos.

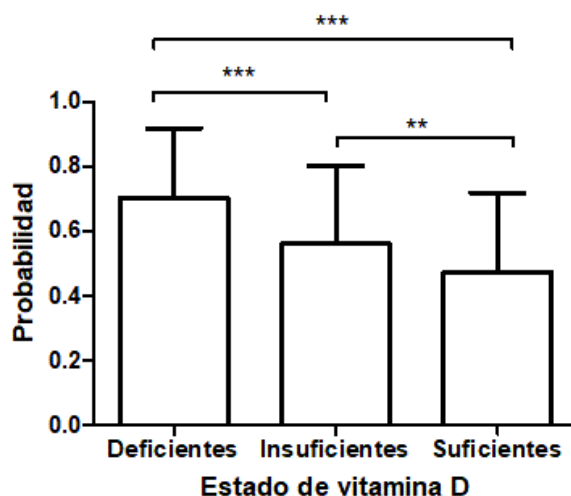


Figura 7. Probabilidad promedio \pm DE del modelo descrito en el Cuadro 7 para establecer la condición de caso según el estado de 25-hidroxivitamina D ($n=505$, *** indica valor de $p < 0,0001$, ** $p < 0,001$).

Debido a que en el grupo control muchos sujetos eran prediabéticos, se analizó el modelo anterior, pero con la variable respuesta según el estado glicémico normal, prediabético y diabético. Se observó que en el grupo de personas prediabéticas no se presentó asociación con los niveles plasmáticos de 25-hidroxivitamina D, HDL, LDL, VLDL, triglicéridos, presencia de hipertensión e IMC. No obstante, sí hubo una asociación positiva con la edad (Cuadro 8).

En cuanto a las personas diabéticas respecto a las personas con un estado glicémico normal se obtuvo asociación negativa con los niveles plasmáticos de 25-hidroxivitamina D, con el LDL y con la ausencia de un diagnóstico de HTA. Mientras que con el IMC y la edad la asociación fue positiva. No hubo asociación con las variables de HDL, VLDL, triglicéridos y sexo. Los valores de OR indican que la probabilidad de que el sujeto sea diabético comparado con que tenga un estadio glicémico normal

es 4,1% menor por cada unidad (ng/mL) que aumente la concentración de 25-hidroxivitamina D plasmática, 71,0% menor si no tiene un diagnóstico de HTA, 19,3% mayor por cada unidad que aumente el IMC y 5% mayor por cada año que aumente la edad (Cuadro 8).

Cuadro 8. Resultados del modelo de regresión logística multivariante según el estado glicémico de los sujetos (n=473).

Estado glicémico normal comparado con:	Variable	β	p	Exp(β)=OR	95% de CI para OR
Prediabético	Intercepto	-6,214	0,008		
	25-hidroxivitamina D	-0,021	0,304	0,979	0,940 - 1,019
	IMC	0,072	0,070	1,075	0,994 - 1,162
	HDL	0,001	0,963	1,001	0,971 - 1,032
	LDL	0,006	0,168	1,006	0,998 - 1,014
	VLDL	-0,151	0,225	0,860	0,674 - 1,098
	Triglicéridos	0,035	0,164	1,035	0,986 - 1,087
	Edad	0,058	0,001	1,060	1,024 - 1,097
	Sexo (masculino)	-0,214	0,550	0,807	0,401 - 1,627
	HTA (sin HTA)	-0,304	0,342	0,738	0,395 - 1,380
Diabético	Intercepto	-4,767	0,025		
	25-hidroxivitamina D	-0,042	0,028	0,959	0,924 - 0,995
	IMC	0,176	0,000	1,193	1,110 - 1,281
	HDL	-0,014	0,212	0,986	0,964 - 1,008
	LDL	-0,008	0,042	0,992	0,984 - 1,000
	VLDL	-0,004	0,766	0,996	0,971 - 1,022
	Triglicéridos	0,006	0,090	1,006	0,999 - 1,013
	Edad	0,049	0,002	1,050	1,017 - 1,084
	Sexo (masculino)	0,218	0,489	1,244	0,670 - 2,308
	HTA (sin HTA)	-1,240	1,48E-8	0,290	0,160 - 0,525

La categoría de referencia fue el estado glicémico normal.

Las probabilidades estimadas a partir del modelo anterior de que un sujeto sea diabético es menor $0,2048 \pm 0,1769$ si efectivamente era parte del grupo control, de $0,2097 \pm 0,1138$ para los prediabéticos y de $0,5855 \pm 0,2283$ para diabéticos (Figura 8). La ANOVA de una sola vía indicó

diferencia entre los grupos ($p < 0,0001$), la prueba post-análisis Tukey estableció diferencias entre la probabilidad de ser normal versus diabético, y prediabético versus diabético.

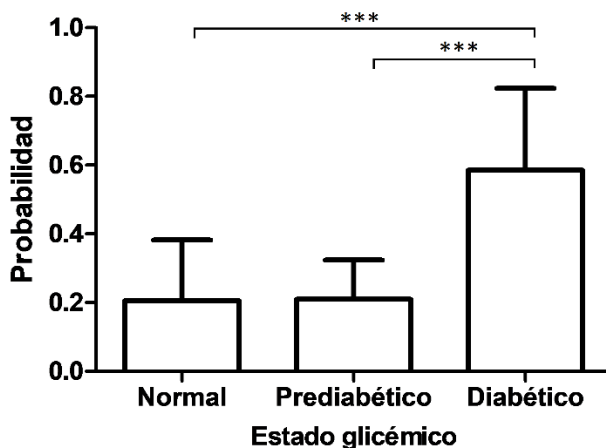


Figura 8. Probabilidad promedio \pm DE de que el modelo descrito en el Cuadro 8 establezca el estado glicémico diabético ($n=499$, *** indica valor de $p < 0,0001$).

Frecuencias alélicas y genotípicas de los SNPs incluidos en el estudio

La genotipificación se realizó para 570 sujetos. Se aplicó un filtro que excluía el SNP si el porcentaje de genotipos obtenidos era menor al 85%, pero no hubo ningún dato que incumpliera este filtro. Los SNPs rs4588 y rs7041 del gen *GC* mostraron menor porcentaje de genotipos asignados ya que algunas muestras de ADN presentaron baja calidad (con respecto a las 570 muestras la disponibilidad de genotipos fue 86,84% y 94,56%). En el Cuadro 9 se muestra el número de observaciones según genotipo para cada SNP y en el Cuadro 10 la frecuencia de cada uno de los alelos.

Cuadro 9. Frecuencias genotípicas para los SNPs incluidos en el estudio.

Gen	SNP	A1	A2	Hom A1	Het	Hom A2	n
GC	rs4588	T	G	0,04	0,35	0,61	495
	rs7041	A	C	0,22	0,52	0,26	539
	rs3755967	A	G	0,04	0,33	0,63	570
CYP2R1	rs10741657	A	G	0,07	0,45	0,48	570
	rs7944926	G	A	0,22	0,52	0,25	570
	rs4944957	A	G	0,23	0,52	0,24	570
	rs12800438	A	G	0,23	0,54	0,23	570
	rs3794060	T	C	0,22	0,52	0,26	568
NADSYN1	rs3829251	A	G	0,09	0,41	0,50	570

Cuadro 10. Frecuencia alélica de los SNPs incluidos en el estudio.

Gen	SNP	Alelos		Casos			Controles		
		A1	A2	Frec A1	Frec A2	n	Frec A1	Frec A2	n
GC	rs4588	T	G	0,22	0,78	546	0,21	0,79	412
	rs7041	A	C	0,49	0,51	584	0,46	0,54	454
	rs3755967	A	G	0,22	0,79	586	0,20	0,80	476
CYP2R1	rs10741657	A	G	0,30	0,70	586	0,29	0,71	476
	rs7944926	G	A	0,47	0,53	586	0,50	0,50	476
	rs4944957	A	G	0,52	0,48	586	0,47	0,53	476
	rs12800438	A	G	0,46	0,54	586	0,53	0,47	476
	rs3794060	T	C	0,47	0,53	582	0,50	0,50	476
	rs3829251	A	G	0,31	0,69	586	0,27	0,73	476
NADSYN1									

En cuanto al equilibrio de Hardy-Weinberg, todos los SNPs estaban en equilibrio. Se utilizó un valor de $p < 0,0001$ para rechazar la hipótesis nula del test (Cuadro 11).

Cuadro 11. Cálculo del equilibrio de Hardy-Weinberg en la muestra total, casos y controles para los genotipos de los SNPs incluidos en el estudio (Alelo1= A1, alelo 2= A2).

SNP	Test	A1	A2	A1A1, A1A2, A2A2	Frec observada Heterocigotos	Frec esperada Heterocigotos	p
rs4588	Todos	T	G	22/171/302	0,35	0,34	0,7923
	Casos	T	G	13/95/165	0,35	0,35	1,0000
	Control	T	G	8/71/127	0,34	0,33	0,8339

rs7041	Todos	A	C	117/282/140	0,52	0,50	0,3003
	Casos	A	C	68/151/73	0,52	0,50	0,6395
	Control	A	C	44/123/60	0,54	0,50	0,2294
rs3755967	Todos	A	G	23/187/360	0,33	0,33	0,8981
	Casos	A	G	13/100/180	0,34	0,34	1,0000
	Control	A	G	9/75/154	0,32	0,31	1,0000
rs10741657	Todos	A	G	39/258/273	0,45	0,42	0,0435
	Casos	A	G	17/144/132	0,49	0,42	0,0058
	Control	A	G	17/102/119	0,43	0,41	0,5259
rs7944926	Todos	G	A	126/299/145	0,52	0,50	0,2416
	Casos	G	A	64/145/84	0,49	0,50	0,9071
	Control	G	A	52/133/53	0,56	0,50	0,0915
rs4944957	Todos	A	G	132/299/139	0,52	0,50	0,2759
	Casos	A	G	81/145/67	0,49	0,50	0,9069
	Control	A	G	45/133/60	0,56	0,50	0,0693
rs12800438	Todos	A	G	132/305/133	0,54	0,50	0,1113
	Casos	A	G	61/150/82	0,51	0,50	0,7244
	Control	A	G	59/134/45	0,56	0,50	0,0519
rs3794060	Todos	T	C	125/298/145	0,52	0,50	0,2406
	Casos	T	C	64/143/84	0,49	0,50	0,8147
	Control	T	C	51/134/53	0,56	0,50	0,0691
rs3829251	Todos	A	G	49/236/285	0,41	0,41	1,0000
	Casos	A	G	28/128/137	0,44	0,43	0,8924
	Control	A	G	19/91/128	0,38	0,40	0,6235

Valores promedio de 25-hidroxivitamina D plasmática según genotipo

En el Cuadro 12 se indican los niveles plasmáticos promedio de 25-hidroxivitamina D según el genotipo, además del número de observaciones para cada genotipo (n), la frecuencia (Frec), el valor de *p* de ANOVA de una sola vía y la prueba post-hoc Tukey. Se obtuvo diferencias de los niveles promedio de 25-hidroxivitamina D entre los genotipos homocigotos para todos los SNPs de este estudio.

Cuadro 12. Niveles plasmáticos promedio de 25-hidroxivitamina D \pm DE de los participantes (ng/mL) según el genotipo para cada SNPs incluido en el estudio.

Gen	SNP	Parámetro	A1A1	A1A2	A2A2	p ANOVA	Tukey (*p<0,05)
GC	rs4588	Genotipo	T/T	T/G	G/G	0,0011	
		n	19	142	249		TT vs TG
		Frec	0,05	0,35	0,61		TT vs GG*
		$\bar{x} \pm DE$ (ng/mL)	19,62 \pm 6,74	23,16 \pm 7,09	25,16 \pm 7,78		TG vs GG*
	rs7041	Genotipo	A/A	A/C	C/C	0,0383	
		n	97	229	112		AA vs AC
		Frec	0,22	0,52	0,26		AA vs CC*
		$\bar{x} \pm DE$ (ng/mL)	22,61 \pm 7,75	24,27 \pm 7,36	25,34 \pm 8,38		AC vs CC
	rs3755967	Genotipo	A/A	A/G	G/G	0,0010	
		n	19	150	284		AA vs AG
		Frec	0,04	0,33	0,63		AA vs GG*
		$\bar{x} \pm DE$ (ng/mL)	20,07 \pm 7,25	22,84 \pm 7,12	25,09 \pm 7,94		AG vs GG*
CYP2R1	rs10741657	Genotipo	A/A	A/G	G/G	0,0221	
		n	29	211	213		AA vs AG
		Frec	0,06	0,47	0,47		AA vs GG*
		$\bar{x} \pm DE$ (ng/mL)	27,67 \pm 9,60	24,30 \pm 7,69	23,49 \pm 7,44		AG vs GG
NADSYN1	rs7944926	Genotipo	G/G	G/A	A/A	0,0309	
		n	100	232	121		GG vs GA
		Frec	0,22	0,51	0,27		GG vs AA*
		$\bar{x} \pm DE$ (ng/mL)	25,91 \pm 7,11	23,78 \pm 7,62	23,36 \pm 8,34		GA vs AA
	rs4944957	Genotipo	A/A	A/G	G/G	0,0130	
		n	112	233	108		AA vs AG
		Frec	0,25	0,51	0,24		AA vs GG*
		$\bar{x} \pm DE$ (ng/mL)	23,28 \pm 8,55	23,67 \pm 7,59	26,03 \pm 6,96		AG vs GG*
	rs12800438	Genotipo	A/A	A/G	G/G	0,0147	
		n	101	240	112		AA vs AG*
		Frec	0,22	0,53	0,25		AA vs GG*
		$\bar{x} \pm DE$ (ng/mL)	26,08 \pm 6,95	23,72 \pm 7,58	23,28 \pm 8,55		AG vs GG
	rs3794060	Genotipo	T/T	T/C	C/C	0,0378	
		n	99	231	121		TT vs TC
		Frec	0,22	0,51	0,27		TT vs CC*
		$\bar{x} \pm DE$ (ng/mL)	25,86 \pm 7,13	23,79 \pm 7,65	23,36 \pm 8,34		TC vs CC
	rs3829251	Genotipo	A/A	A/G	G/G	0,0390	
		n	42	184	227		AA vs AG

	Frec	0,09	0,41	0,50		AA vs GG*
	$\bar{x} \pm DE$ (ng/mL)	21,79 \pm 8,18	23,74 \pm 7,59	24,89 \pm 7,73		AG vs GG

Análisis de asociación de los SNPs con los niveles plasmáticos de 25-hidroxivitamina D

Para el análisis de la asociación entre los alelos de los SNPs y los niveles plasmáticos de 25-hidroxivitamina D se utilizó un modelo de regresión lineal, en el cual se utilizó las covariables: estado glicémico de los participantes (normal, prediabético o diabético), el sexo, la edad, el IMC, ausencia de HTA, perfil lipídico y los componentes de ancestría. En este modelo se asume que las covariables y el alelo producen un efecto aditivo en la varianza de la muestra. Se observó que luego de realizar la corrección por Bonferroni los SNPs rs4588 y rs3755967 del gen *GC* se asociaron con los niveles plasmáticos de vitamina D, el alelo T de rs4588 y el alelo A de rs3755967 se asociaron con disminución del nivel plasmático de 25-hidroxivitamina D, resalta el hecho de que ambos alelos corresponden al segundo alelo más común para dicho SNP (MAF, *minor allele frequency*) en la muestra de estudio (Cuadro 13).

Cuadro 13. Asociación del alelo MAF de los SNPs y los niveles plasmáticos de 25-hidroxivitamina D.

Gen	SNP	MAF	n	β	IC 95%	<i>p</i>	<i>p</i> ajustado
GC	rs4588	T	410	-2,357	-3,544 a -1,170	0,0001167	0,00105
GC	rs3755967	A	453	-2,258	-3,427 a -1,088	0,0001758	0,001582
CYP2R1	rs10741657	A	453	1,466	0,3589 a 2,573	0,009768	0,08791
NADSYN1	rs3829251	A	453	-1,336	-2,369 a -0,3025	0,01163	0,1047
NADSYN1	rs4944957	A	453	-1,133	-2,109 a -0,1578	0,02327	0,2094
NADSYN1	rs7944926	G	453	1,12	0,1482 a 2,093	0,02439	0,2195
NADSYN1	rs3794060	T	451	1,108	0,1309 a 2,085	0,02676	0,2409
NADSYN1	rs12800438	A	453	1,085	0,09047 a 2,080	0,03305	0,2975
GC	rs7041	A	438	-0,9743	-1,980 a 0,03189	0,0584	0,5256

Modelo de regresión lineal controlado por las covariables: sexo, edad, IMC, estado glicémico, colesterol total, LDL, HDL, VLDL, triglicéridos, HTA, ancestría.

Análisis de asociación de los SNPs con la condición de casos y controles

Se realizó un modelo de regresión logística que tuvo como respuesta el fenotipo DM2 o control. Se incluyeron como covariables los alelos, el sexo, la edad, el IMC, el perfil de lípidos, la concentración

plasmática de 25-hidroxivitamina D y la ancestría. Ninguno de los alelos estudiados se asoció con la DM2 (Cuadro 14).

Cuadro 14. Asociación del alelo MAF de los SNPs con la condición de caso o control.

Gen	SNP	MAF	n	OR	IC 95%	<i>p</i>	<i>p</i> ajustado
NADSYN1	rs3829251	A	493	1,396	1,005 a 1,939	0,0467	0,4203
NADSYN1	rs12800438	A	493	0,7314	0,5371 a 0,996	0,04712	0,4240
NADSYN1	rs4944957	A	493	1,301	0,9608 a 1,762	0,0888	0,7992
CYP2R1	rs10741657	A	493	1,202	0,8511 a 1,697	0,2966	1
NADSYN1	rs7944926	G	493	0,8609	0,6365 a 1,164	0,3311	1
NADSYN1	rs3794060	T	491	0,8791	0,6501 a 1,189	0,4028	1
GC	rs3755967	A	493	1,103	0,7554 a 1,61	0,6124	1
GC	rs4588	T	445	1,075	0,7228 a 1,598	0,7215	1
GC	rs7041	A	478	1,049	0,7689 a 1,43	0,7644	1

Modelo de regresión lineal controlado por las covariables: sexo, edad, IMC, colesterol total, LDL, HDL, VLDL, triglicéridos, niveles plasmáticos de 25-hidroxivitamina D, HTA, ancestría.

Cuando se realizó el modelo de regresión logística caso - control con los genotipos de los SNPs, no hubo asociación entre los SNPs estudiados y la DM2. En este se introdujeron las mismas covariables que en el modelo de los alelos: el sexo, la edad, el, IMC, el perfil de lípidos, la concentración plasmática de 25-hidroxivitamina D, la HTA y la ancestría (Cuadro 15).

Cuadro 15. Análisis de asociación genotípica para los SNPS estudiados y la DM2.

Gen	SNP	<i>p</i> no ajustado	<i>p</i> ajustado - Bonferroni
NADSYN1	rs3829251	0,1024	0,9219
NADSYN1	rs12800438	0,1369	1
NADSYN1	rs4944957	0,1993	1
CYP2R1	rs10741657	0,5054	1
NADSYN1	rs3794060	0,5416	1
NADSYN1	rs7944926	0,5483	1
GC	rs3755967	0,7722	1
GC	rs4588	0,9045	1
GC	rs7041	0,9388	1

Modelo de regresión logística controlado por covariables: sexo, edad, IMC, colesterol total, LDL, HDL, VLDL, triglicéridos, niveles plasmáticos de 25-hidroxivitamina D, HTA, ancestría.

Debido a que los SNPs estudiados no se asociaron con DM2, no se construyó un modelo que los incluyera.

Prueba de epistasis y desequilibrio de ligamiento entre los SNPs

Según el análisis de epistasis, se obtuvo que en las personas con DM2 no existía interacción entre los SNPs estudiados (Cuadro 16). El análisis por bloques estableció que los SNPs rs3755967 y rs4588 del gen *GC* se encuentran en desequilibrio de ligamiento, así como los SNPs rs4944957 y rs12800438, rs3794060 y rs12800438, rs4944957 y rs3794060 del gen *NADSYN1* (Cuadro 17).

Cuadro 16. Análisis de epistasis, se muestra el mejor resultado de Chi cuadrado y el SNP correspondiente.

Gen	SNP	Resultados significativos de epistasis	N° de pruebas	SNPs con el mejor resultado
<i>GC</i>	rs4588	0	8	rs3829251
<i>GC</i>	rs7041	0	8	rs4944957
<i>GC</i>	rs3755967	0	8	rs3829251
<i>CYP2R1</i>	rs10741657	0	8	rs7944926
<i>NADSYN1</i>	rs7944926	0	7	rs4944957
<i>NADSYN1</i>	rs4944957	0	8	rs3794060
<i>NADSYN1</i>	rs12800438	0	8	rs3794060
<i>NADSYN1</i>	rs3794060	0	7	rs4944957
<i>NADSYN1</i>	rs3829251	0	8	rs4588

Cuadro 17. Análisis de desequilibrio de ligamiento, se muestra el R^2 correspondiente al SNP A con el SNP B.

Gen	SNP A	SNP B	R^2
GC	rs4588	rs7041	0,256649
	rs4588	rs3755967	0,88052
	rs7041	rs4588	0,256649
	rs7041	rs3755967	0,244917
	rs3755967	rs4588	0,88052
	rs3755967	rs7041	0,244917
NADSYN1	rs7944926	rs4944957	0,924266
	rs7944926	rs12800438	0,902148
	rs7944926	rs3794060	0,995987
	rs7944926	rs3829251	0,405204
	rs4944957	rs7944926	0,924266
	rs4944957	rs12800438	0,972264
	rs4944957	rs3794060	0,920571
	rs4944957	rs3829251	0,375583
	rs12800438	rs7944926	0,902148
	rs12800438	rs4944957	0,972264
	rs12800438	rs3794060	0,89823
	rs12800438	rs3829251	0,364578
	rs3794060	rs7944926	0,995987
	rs3794060	rs4944957	0,920571
	rs3794060	rs12800438	0,89823
	rs3794060	rs3829251	0,404679
	rs3829251	rs7944926	0,405204
	rs3829251	rs4944957	0,375583
	rs3829251	rs12800438	0,364578
	rs3829251	rs3794060	0,404679

Discusión

Con esta investigación se buscaba determinar si existe una relación entre los niveles plasmáticos de 25-hidroxivitamina D y la DM2, así como una relación de los SNPs de genes relacionados con la síntesis y el transporte de la vitamina D con la DM2 en una población costarricense. Los resultados indican que en la muestra estudiada: podría existir una asociación ($p= 0,058$) entre los niveles plasmáticos de 25-hidroxivitamina D y la DM2; no hubo asociación entre los SNPs seleccionados y la DM2. También el análisis estadístico obtuvo una correlación inversa entre la edad, el IMC, los triglicéridos, la glicemia en ayunas y la PAS con los niveles plasmáticos de 25-hidroxivitamina D, los cuales son factores que aumentan el riesgo de desarrollar DM2 (101–104).

La asociación de 25-hidroxivitamina D con la DM2 ha sido establecida en estudios observacionales en poblaciones de distinto origen étnico. El presente estudio realizado en una muestra de población costarricense concuerda con datos de otras poblaciones como el estudio NAHNES-III (3) en el cual las personas de origen latinoamericano (hispanos) de Estados Unidos presentaron relación inversa entre los niveles de 25-hidroxivitamina D y el riesgo de DM2. Además, es el primer reporte de este tipo en personas costarricenses en el contexto de DM2.

Niveles plasmáticos de 25-hidroxivitamina D en la muestra

En cuanto a la distribución porcentual de personas con niveles plasmáticos de 25-hidroxivitamina D en rango de suficiencia, insuficiencia y deficiencia en la muestra resalta el hecho de que la cantidad de personas deficientes e insuficientes es aproximadamente dos tercios. Según la literatura publicada, no existen datos poblacionales realizados sistemáticamente que cuantifiquen el estado de la vitamina D de la población costarricense. Mediante revisión exhaustiva de literatura, hasta la fecha existen 4 publicaciones (105–108) y 5 tesis (109) relacionados con el estado de vitamina D en el país. En un estudio de pacientes adultos asmáticos atendidos en un centro médico costarricense de tercer nivel se evidenció que: de las 121 personas, solamente 12 (9,92%) presentaban concentraciones en sangre de 25-hidroxivitamina D que eran suficientes, mientras que en 73 (60,33%) eran insuficientes y 36 (29,75%) eran deficientes (107). En otro estudio que incluyó 616 niños asmáticos costarricenses se identificó que 21 (3,41%) eran deficientes, 152 (24,68%) eran insuficientes y 443 (71,91%) suficientes (110). Castro *et al* 2015 (109) cuantificaron los niveles plasmáticos de 25-hidroxivitamina D en 120 estudiantes de un centro universitario costarricense

elegidos aleatoriamente, ellos identificaron que 30 (25%) de estos eran deficientes o insuficientes y 90 (75%) eran suficientes de 25-hidroxivitamina D. Los resultados de los trabajos antes detallados varían por edad, por condición de salud y por ubicación geográfica, por lo cual no son comparables entre sí, ni tampoco con esta investigación. Sin embargo, generan la interrogante de cuál es realmente el estado de vitamina D de la población costarricense.

Además, esta tesis revela que las personas con DM2 presentaron niveles plasmáticos de 25-hidroxivitamina D inadecuados más frecuentemente que los controles. Este mismo punto también se evidenció en la distribución frecuencial de las mediciones de 25-hidroxivitamina D en la que se obtuvo que la mayoría de los sujetos presenta niveles plasmáticos de 25-hidroxivitamina D < 30 ng/mL, tanto en los casos como en los controles.

La OR de posibles deficientes de 25-hidroxivitamina D *versus* suficientes fue 2,5 veces mayor en los casos que en los controles. Igualmente, la OR de posibles insuficientes *versus* suficientes fue 1,16 veces mayor en los casos que en los controles. Sin embargo, este aumento del riesgo de deficiencia e insuficiencia de vitamina D cuando se es una persona con DM2 puede ser mediado por factores combinados y no solo por la DM2 (anexo 4, Cuadro 20). Por ejemplo, el sobrepeso y la obesidad son condiciones que se han asociado con los niveles de vitamina D plasmáticos disminuidos (111). Al comparar el IMC de los casos y los controles resulta evidente que el IMC fue mayor en los diabéticos, es decir que el incremento de IMC y el ser diabético son factores de riesgo para la deficiencia o la insuficiencia de 25-hidroxivitamina D. En el grupo de casos se registró un mayor número de personas con HTA, la literatura publicada sustenta que las personas hipertensas presentan frecuentemente niveles disminuidos de vitamina D (92,93), en este sentido, también se encontró una correlación negativa entre la 25-hidroxivitamina D plasmática y la PAS. Contrario a lo que se esperaría, los controles presentaron mayores niveles de LDL que los casos, si se tiene en cuenta que la vitamina D es derivada del colesterol y que por lo tanto su nivel plasmático podría verse influido por el aumento o la disminución del colesterol, este es un punto a tomar en cuenta al examinar el porqué fue más frecuente la deficiencia y la insuficiencia de 25-hidroxivitamina D en los casos que en los controles; no obstante, en la muestra de este estudio no hubo correlación entre el colesterol total, el LDL, el HDL o el VLDL y el nivel plasmático de 25-hidroxivitamina D.

Debe resaltarse que en el grupo control aproximadamente la mitad de las personas presentó prediabetes, es decir que ya tenían un proceso que alteraba su metabolismo y en el cual igualmente existe resistencia a la insulina. Lo anterior podría confundir la asociación de los niveles plasmáticos de 25-hidroxivitamina D con la DM2, especialmente por tratarse de un estudio caso (presencia de la condición estudiada) control (ausencia de la condición control), ya que existe la posibilidad que el grupo control incluyera personas que serán diagnosticadas como diabéticas en un corto o mediano plazo. Adicionalmente, la vitamina D produce efectos biológicos que favorecen la secreción y la sensibilidad a la insulina, por lo que las personas prediabéticas podrían presentar anomalías en la función de la vitamina D (2,27–29). Sin embargo, los resultados no mostraron diferencia entre las medias de los niveles plasmáticos de 25-hidroxivitamina D de las personas prediabéticas con las personas en estadio normal.

Niveles plasmáticos de 25-hidroxivitamina D y el exceso de peso

Los niveles plasmáticos promedio de 25-hidroxivitamina D en las personas sin exceso de peso (IMC < 25 kg/m²) fueron mayores que en aquellas personas con exceso de peso. Según el modelo de regresión logística, al comparar las personas con IMC en la categoría de obesidad grado I, o en la categoría II y III con las personas con IMC normal la relación fue inversa para los niveles plasmáticos de 25-hidroxivitamina D. Además, el modelo de regresión lineal para los niveles plasmáticos de 25-hidroxivitamina D y el modelo de regresión logística para el estado de deficiencia, insuficiencia o suficiencia de 25-hidroxivitamina D obtuvieron que el incremento del IMC se asoció con bajo nivel plasmático de 25-hidroxivitamina D y con un aumento del riesgo de ser deficiente o insuficiente. Este resultado -un IMC mayor asociado con un nivel plasmático de 25-hidroxivitamina D menor- concuerda con el estudio *Diabetes Prevention Program*, en el cual se analizaron las personas del grupo placebo y las que realizaron modificaciones al estilo de vida. En dicho estudio, todos los participantes fueron prediabéticos al inicio del periodo de observación. En ese mismo estudio, se determinó que tanto al comienzo como dos años después los niveles plasmáticos de 25-hidroxivitamina D y el peso eran indirectamente proporcionales (111).

La relación entre vitamina D y la obesidad aún se encuentra en discusión. Probablemente implique fenómenos multifactoriales que convergen en la obesidad, como por ejemplo la resistencia a las catecolaminas, a la insulina, la inflamación producida por la obesidad, la disminución de la

biodisponibilidad de vitamina D y factores del comportamiento como la poca exposición solar y la baja ingesta dietética de vitamina D (112).

En cuanto a la disminución de la biodisponibilidad de vitamina D se ha formulado la hipótesis de la dilución de la vitamina, en la cual la liposolubilidad de la vitamina D favorece su depósito en el tejido adiposo y, por lo tanto, que colabore en el establecimiento de la deficiencia de esta hormona. El punto anterior ha sido estudiado tanto en personas con obesidad como en aquellas con un peso normal (113), así como en personas suplementadas con 25-hidroxivitamina D (11,114). Se ha argumentado que un modelo hiperbólico, en lugar de uno lineal, describiría apropiadamente el componente dilucional de la vitamina D en la grasa. En un estudio con este tipo de modelo se explicó el 13% de la variabilidad de 25-hidroxivitamina D y su relación con el peso, mientras que un modelo lineal explicó el 10%. La aproximación del modelo hiperbólico para explicar la variabilidad de los datos sigue siendo relativamente baja, probablemente porque otros factores biológicos que afectan los niveles plasmáticos de 25-hidroxivitamina D no se conocen o no se incluyen (115). Lo que sí es consistente en los estudios mencionados es la relación inversa entre los niveles plasmáticos de 25-hidroxivitamina D y el peso corporal.

Con respecto a los niveles de vitamina D, una investigación comparó la concentración plasmática de 25-hidroxivitamina D, la cantidad de tejido adiposo y la concentración total de vitamina D3 y D2 en el tejido adiposo subcutáneo y en el omento de mujeres con obesidad (cirugía bariátrica, n=21) o en aquellas con IMC menor a 25 kg/m² (cirugía ginecológica, n=15). Se determinó que la concentración total de vitamina D (la cual corresponde a la plasmática más la que se encuentra depositada en el tejido adiposo) era proporcional a la cantidad de tejido adiposo. No hubo diferencia en la concentración de vitamina D del tejido adiposo entre ambos grupos. Los resultados de este estudio apoyan la hipótesis dilucional, es decir que en obesidad se reduce la biodisponibilidad de vitamina D debido a su liposolubilidad. No obstante, no es posible generalizar estos datos a aquellas personas con bajos niveles de vitamina D, pues en este estudio la deficiencia de vitamina D no fue considerada como un criterio de inclusión. (113).

Cuando se analizaron los niveles plasmáticos de 25-hidroxivitamina D de 75 personas que formaron parte del estudio de suplementación con vitamina D derivado del estudio Tromsø (11) -comentado

más adelante- en el que 41 personas recibieron 20000 IU semanales de 25-hidroxitamina D por 5 años y 34 sujetos placebo, se observó que los niveles plasmáticos de 25-hidroxitamina D disminuían en los primeros 3 meses y luego se estabilizaban. En el grupo de vitamina D, la concentración de 25-hidroxitamina D en la biopsia de tejido subcutáneo abdominal realizada justo luego de 5 años de suplementación fue mayor que un año después. Sin embargo, el número de personas con datos de las biopsias fue muy reducido. Este grupo de investigación hipotetiza que el almacén de vitamina D en los tejidos (específicamente en el tejido graso) podría tener relevancia en el mantenimiento de los niveles plasmáticos, ya que la 25-hidroxitamina D que fue almacenada durante la suplementación se libera desde el tejido adiposo (114). En otras palabras, el efecto dilucional de la vitamina D sería beneficioso luego de suspender la suplementación.

Por otro lado, el mecanismo biológico que explica la relación inversa entre la deficiencia de vitamina D y el aumento del peso corporal no ha sido aún esclarecido. Como se indicó en el marco teórico de este trabajo, la vitamina D produjo en ratas la disminución del peso corporal cuando se administró suplementación con 1,25-hidroxitamina D (41). No obstante, estudios con adipocitos de personas con DM2 (96) y los ratones null-VDR (97) indican que la vitamina D favorece la adipogénesis y el aumento del peso corporal. En la presente investigación con población costarricense, el IMC es mayor conforme se reduce el nivel de 25-hidroxitamina D plasmático, no hubo diferencia en el colesterol total entre los grupos de 25-hidroxitamina D, y los triglicéridos son mayores en las personas con deficiencia de vitamina D que en aquellas con suficiencia (anexo 3, Cuadro 19). Es decir, existe la probabilidad de que aumente la lipogénesis y el depósito de grasas conforme se reduce el nivel plasmático total de 25-hidroxitamina D.

Vitamina D y DM2

De acuerdo con los resultados del presente estudio, el efecto de la reducción plasmática de 25-hidroxitamina D en la probabilidad de desarrollar DM2 es sustancialmente menor que el que producen factores ampliamente conocidos como la HTA y el aumento del peso corporal. La diferencia entre los casos y los controles en cuanto a sus valores promedio de 25-hidroxitamina D es de aproximadamente 3 ng/mL, lo cual según el modelo del Cuadro 7 correspondería a un aumento de 8,4% del riesgo de presentar DM2.

Las variables incluidas en el modelo de regresión logística del Cuadro 7 fueron elegidas según el probable efecto biológico en la DM2 o el metabolismo de la vitamina D. Este modelo presentó mejor probabilidad de asignar un caso que un control. También presentó mayor probabilidad si las personas tenían los niveles plasmáticos de 25-hidroxivitamina D en rangos de deficiencia. Así mismo, según el modelo del Cuadro 7, la probabilidad de establecer una persona con DM2 es mayor cuando su estadio glicémico es, efectivamente distinto, a la categoría de normal o prediabético. El comportamiento anterior podría significar que efectivamente estas variables sí se encuentran asociadas con la fisiopatología de DM2 y que este modelo presentará mejores resultados cuando se tenga alta sospecha de DM2 que cuando la sospecha sea baja. El modelo requeriría validación en otra muestra de la misma población pero esta fuera de los objetivos de esta tesis.

Los niveles plasmáticos de 25-hidroxivitamina D representan un biomarcador del estado de vitamina D, es decir que no corresponde a una cuantificación *per se* de las funciones de la vitamina D o a su relación con la resistencia y la secreción de la insulina. El porcentaje en que contribuye la insuficiencia o la deficiencia de vitamina D en el proceso patogénico de la DM2 puede ser menor que los factores de riesgo clásico como obesidad, hipertensión y dislipidemia, como muestran estos resultados. Lo anterior sería una explicación ante el poco éxito que ha tenido la suplementación con vitamina D en la prevención del desarrollo de DM2 en las personas prediabéticas. Los ensayos clínicos de suplementación de vitamina D en personas prediabéticas no incluyen intervenciones relacionadas con la actividad física y la alimentación saludable. Por ejemplo, tres estudios aleatorizados y controlados con placebo en los cuales el objetivo primario fue determinar si la suplementación con 25-hidroxivitamina D disminuía la progresión a DM2 en personas prediabéticas, y que no tuvieron éxito son: el estudio *Vitamin D and type 2 diabetes study* (D2d) con población estadounidense de diferente origen étnico (10), el estudio Tromsø con población noruega (11), el estudio *Diabetes Prevention with active Vitamin D* (DPVD) con población japonesa (12,13). Otros ensayos clínicos con menos cantidad de participantes, intervenciones con menos unidades de 25-hidroxivitamina D o tiempo corto de seguimiento tampoco demostraron efectos claros en la prevención de DM2 (116–119). En personas con sobrepeso u obesidad y deficientes de vitamina D no hubo mejoría en la secreción o sensibilidad a la insulina (120).

El estudio aleatorizado, controlado con placebo, doble ciego D2d incluyó a personas mayores de 30 años con diagnóstico de prediabetes e IMC entre 24 y 42, no se seleccionaron por los niveles de 25-hidroxivitamina D basales. Se determinó un HR de 0,88 (95% IC: 0,75–1,04; $p=0,12$) al utilizar 4000 IU diarias de 25-hidroxivitamina D ($n=1211$) por 2,5 años *versus* placebo ($n=1211$). El análisis del subgrupo con niveles plasmáticos de 25-hidroxivitamina D de ≤ 12 ng/mL obtuvo un HR 0,38 (95% IC, 0,18 to 0,80) pero solo correspondía al 4,3% del total de participantes (10).

El ensayo clínico noruego aleatorizado, controlado con placebo en el cual se incluyó a personas prediabéticas, administró cápsulas de 20000 IU/semana o placebo durante 5 años. A pesar de que las personas suplementadas con 25-hidroxivitamina D duplicaron el valor promedio de este metabolito en plasma, la incidencia acumulada de DM2 entre el grupo de 25-hidroxivitamina D *versus* placebo durante 5 años fue HR de 0,90 (IC 95%: 0,69–1,18, $p=0,45$); es decir, que la suplementación con 25-hidroxivitamina D no previno el desarrollo de DM2. El análisis de subgrupo se realizó en personas con niveles ≤ 20 ng/mL de 25-hidroxivitamina D al inicio, y que a los 5 años tuvieron niveles entre 32 y 50 ng/mL del grupo con vitamina D ($n=63$), *versus* personas del grupo placebo deficientes de vitamina D, tanto al inicio como a los 5 años ($n=49$). El HR de este análisis fue de 0,79 (95% IC 0,46–1,37, $p=0,40$); es decir, que la suplementación podría ser relevante en los prediabéticos con deficiencia de vitamina D, más no es todas las personas prediabéticas (11).

En cuanto al DPVD, fue un ensayo clínico aleatorizado, doble ciego y controlado con placebo, en el cual se utilizó 0,75 μ g/día de eldecalcitol, un análogo de 1,25 hidroxivitamina D, por 2 años y 10 meses (144 semanas); *versus* placebo. Con esta intervención se obtuvo un HR de 0,87 (IC 95%: 0,68–1,09; $p=0,37$), es decir que tampoco disminuyó el paso de prediabetes a diabetes tipo 2 (12,13).

Los análisis de subgrupos de los estudios D2d (10) y Tromsø (11) con participantes que tenían niveles plasmáticos de 25-hidroxivitamina D iniciales bajos, indican que existe la posibilidad de que las personas prediabéticas y con menores niveles de vitamina D se benefician de la suplementación con vitamina D. No obstante, se requerirían ensayos clínicos específicos para sustentar esta información. Un estudio controlado con placebo en población prediabética de Irán en personas con niveles plasmáticos de 25-hidroxivitamina D < 30 ng/mL, obtuvo mejoría en el índice HOMA-IR (2,6 *versus* 3,1, $p=0,005$) y en la respuesta glicémica 2 horas después de una carga de 75 g de glucosa (129

mg/dL versus 139 mg/dL, $p= 0,06$) al suplementar oralmente con 25-hidroxivitamina D 5000 IU/semana durante 3 meses + 50000 IU/mes durante 3 meses. Sin embargo, es un estudio que incluye 162 personas inicialmente pero analizó los datos de 88 personas, no son resultados a largo plazo ni evalúan si esas personas progresan o no de prediabetes a DM2. Este estudio analizó 88 personas y no reportó adherencia al tratamiento (121).

Efecto biológico de los SNPs en el gen GC:

Solamente un 0,01% del total de 25-hidroxivitamina D compone la fracción libre, casi el 100% de esta hormona se encuentra unida a proteínas plasmáticas, principalmente a la GC (122). Por lo tanto, se deduce que la afinidad que presente GC por 25-hidroxivitamina D tendrá un impacto en la concentración plasmática de esta hormona y, por ende, en el estado de deficiencia, insuficiencia o suficiencia de 25-hidroxivitamina D.

En este estudio, los alelos de los SNPs que resultaron asociados con la disminución de los niveles plasmáticos de 25-hidroxivitamina D son el alelo T de rs4588, que produce un cambio no sinónimo en la proteína de unión a vitamina D y el alelo A de rs3755967, que se encuentra en un intrón. El SNP rs7041 también produce un cambio no sinónimo en la proteína GC, el alelo A de este SNP se asoció con niveles bajos de 25-hidroxivitamina D, aunque esta asociación desaparece al controlar el modelo de regresión logística por el perfil lipídico y la presencia de HTA. El cambio de aminoácido que produce rs4588 y rs7041 en la proteína GC produce distinta afinidad de esta proteína por los metabolitos de vitamina D. A pesar de que la asociación de rs7041 con los niveles plasmáticos de 25-hidroxivitamina D desaparece cuando se controlan los grupos por sus niveles de lípidos y personas hipertensas, estos resultados deberían corroborarse en otros estudios con esta misma población, ya que es un SNP ampliamente asociado con este parámetro en otras poblaciones, que produce cambios con posible relevancia bioquímica, fisiológica y clínica en la afinidad de la proteína ligadora de vitamina D (123).

La proteína GC presenta varias isoformas, de las cuales GC1F, GC1S y GC2 son las más frecuentes. Estas isoformas difieren en los aminoácidos en la posición 416 y 420, y su fenotipo es afectado por rs7041 y rs4588 respectivamente. La posición 416 de GC1F corresponde a Asp, mientras que en el

caso de GC1S el aminoácido es Glu. Por su parte, GC1F y GC2 difieren en la posición 420, GC1F presenta una Thr y GC2 una Lys. GC1S y GC2 tienen dos diferencias en la secuencia de aminoácidos, en la posición 416 GC1S tiene un Glu y GC2 un Asp, en la posición 420 GC1S tiene una Thr y GC2 una Lys (124–126). No se conoce hasta el momento si el polimorfismo rs3755967 es funcional, y su asociación con los bajos niveles de 25-hidroxivitamina D podría deberse a que se encuentra en desequilibrio de ligamiento con el rs4588.

Los SNPs asociados con los niveles plasmáticos de 25-hidroxivitamina D en la presente tesis parecen modificar la estructura terciaria de GC, de tal forma que brindan características biocinéticas distintas a la 25-hidroxivitamina D. El genotipo GG de rs4588 que codificaría por una Thr en la posición 420, presentó mayor frecuencia que el genotipo heterocigoto y homocigoto TT. El genotipo heterocigoto AC de rs7041 fue el más frecuente. Igualmente, el genotipo GG para rs3755967 fue el más frecuente en esta muestra. En cuanto a los alelos, el alelo G para rs4588 (Thr) fue el más frecuente tanto en los casos como en los controles, lo mismo sucedió con el alelo C (Glu) de rs7041 y G para rs375967.

Los SNPs 4588 y rs7041 en el gen que codifica por la proteína GC tienen impacto en la respuesta a la suplementación con 25-hidroxivitamina D, según un estudio de cohorte de 234 participantes adultos originarios de Arabia Saudita que presentaban deficiencia de 25-hidroxivitamina D. Los investigadores observaron que las personas con el genotipo GG en rs4588 presentaban mejor respuesta de los niveles plasmáticos de 25-hidroxivitamina D total, luego de la suplementación, que los genotipos TT o TG. De igual forma se obtuvo mejor respuesta en aquellas personas con genotipo CC en rs7041, que aquellos AC o AA. Los niveles de la fracción libre de 25-hidroxivitamina D y de la biodisponible no fueron diferentes entre los genotipos de rs4588 ($p=0,67$ y $0,52$ respectivamente), pero sí lo fueron para los distintos genotipos de rs7041 ($p=0,05$ y $0,01$ respectivamente). En esta cohorte, la OR de riesgo de no respuesta a la suplementación (ajustada por edad, sexo, IMC, niveles basales de 25-hidroxivitamina D y otros alelos) fue de 3,2 (IC 95% 2,1-6,6) para el alelo T sobre G del SNP rs4588, y de 2,9 (IC 95% 1,9-4,5) para el alelo A sobre C del SNP rs7041 (127).

El genotipo AA de rs7041 en el gen codifica para GC se asoció con menor nivel plasmático de 25-hidroxivitamina D que el genotipo AC o CC en una cohorte de 727 mujeres premenopáusicas de origen caucásico. Igualmente, el genotipo TT de rs4588 se asoció con valores más bajos de 25-

hidroxivitamina D en plasma que los genotipos TG o GG (128). Estos datos coinciden con los obtenidos en esta muestra costarricense, ya que las personas con el genotipo TT presentaron menor nivel de 25-hidroxivitamina D que las personas con GG, y GG y los niveles plasmáticos de los portadores del genotipo AA de rs7041 eran menores que los de los participantes con otros genotipos.

En el estudio anterior de mujeres premenopáusicas (128) y en esta tesis se realizó el análisis estadístico con la concentración total de 25-hidroxivitamina D y no con la fracción libre. No obstante, un estudio observó distintos resultados al utilizar la fracción biodisponible o la fracción total en sus análisis. Además, se evaluó la influencia de los SNPs rs4588 y rs7041 en los niveles plasmáticos totales de 25-hidroxivitamina D y en la concentración plasmática de GC (123). Los niveles plasmáticos de 25-hidroxivitamina D totales y de GC fueron menores en los sujetos afrodescendientes que en los caucásicos estadounidenses, pero la fracción biodisponible no fue diferente entre los grupos. Estos investigadores proponen que estas diferencias entre los valores de 25-hidroxivitamina D total y la fracción libre probablemente se debe a las diferencias fenotípicas de la proteína GC, en las cuales participan los SNPs rs4588 y rs7041 (123). Así mismo, en 472 personas de la población noruega la medición directa de la fracción libre acortó las diferencias de 30% a 9% entre fenotipos GC2/GC2 y GC1S/GC1S (129).

A pesar de que algunos alelos de los SNPs del presente estudio se asociaron con la concentración plasmática de 25-hidroxivitamina D, y que los niveles plasmáticos de 25-hidroxivitamina podrían asociarse con la DM2, ninguno de los 9 SNPs se asoció con la DM2. Esto puede explicarse por al menos dos razones. La primera es que, como fue discutido previamente, la DM2 es una enfermedad multifactorial y con una evolución de años, por lo que la influencia de la vitamina D o los SNPs estudiados en el mecanismo patogénico de la DM2 es menor que los otros factores de riesgo. La segunda razón podría deberse a la frecuencia de cada uno de los alelos y genotipos en la muestra. En cuanto a los alelos, las frecuencias alélicas de rs4588, rs3755967 y rs7041 del gen GC son similares en los casos y en los controles. En cuanto a los genotipos, el rs4588 presentó una frecuencia del genotipo TT de 0,05 *versus* 0,35 de TG y 0,61 de GG, es decir, que la frecuencia del genotipo que mostró menor nivel de 25-hidroxivitamina D fue baja en la muestra y no resultó determinante en la probabilidad de presentar DM2. Lo mismo sucedió con rs3755967, el genotipo con menor nivel

plasmático de 25-hidroxivitamina D presentó una frecuencia de 0,04. Lo que indica que estas variantes podrían no ser relevantes en el riesgo de ser diabético en población costarricense.

Limitaciones del estudio y recomendaciones:

Las limitaciones de este estudio observacional abarcan aspectos relacionados con el estado glicémico del grupo control, el uso de la concentración plasmática total de 25-hidroxivitamina D como biomarcador del estado de vitamina D, los análisis genéticos y la reproducibilidad del estudio. Todos estos se explican con detalle en los párrafos siguientes y deben tenerse presentes al valorar los resultados obtenidos.

Con respecto al estado glicémico, el grupo control incluyó personas sin alteraciones en el metabolismo de la glucosa según los rangos establecidos por la *American Diabetes Association* (100) de glicemia en ayunas y HbA1C, también en este grupo hubo personas prediabéticas (100 personas de las 195 controles incluidos en los modelos de regresión logística, Cuadro 7 y 8). Esta división entre un estadio normal, prediabético o con DM2 se vuelve importante debido a que estos tres grupos presentan riesgo distinto de eventos cardiovasculares mayores como infarto del miocardio, ictus y muerte cardiovascular (130–133).

Los investigadores del proyecto N° 742-B0-339 corroboraron que las personas del grupo control no tuvieran glicemias en ayunas alteradas, pero debido a que el protocolo del proyecto fue anterior a la publicación de la *American Diabetes Association* (134) y la Organización Mundial de la Salud (135) del 2011, las cuales validaban el uso de HbA1C como criterios diagnósticos de DM2, no se excluyeron del grupo control a aquellas personas con una HbA1C en rangos de prediabetes. Debido a lo anterior, el presente estudio observacional no corresponde a un grupo de normoglicemia *versus* un grupo de personas con DM2, sino que es un estudio que caracteriza a un grupo sin diagnóstico de DM2 *versus* con DM2. Esta diferencia entre la forma de recolección de la muestra y los criterios vigentes para clasificar la DM2 (100) se trató de solventar mediante varias formas: (1) al reclasificar a los sujetos del estudio en normales, prediabéticos y personas con DM2, lo cual fue posible debido a que todas las personas de la muestra se les cuantificó HbA1C al momento de la inclusión en el estudio; (2) al probar el modelo de regresión logística según estos tres estadios, en este modelo no hubo

diferencia entre los normales y los prediabéticos. Es decir, acorde con las características incluidas en el modelo de regresión logística, las personas normales y prediabéticas no difieren entre sí.

Otra de las limitaciones de la actual investigación se relaciona con el biomarcador utilizado para definir el estado de vitamina D de las personas, ya que en este estudio se empleó solamente los niveles plasmáticos totales de 25-hidroxivitamina D. Como se indicó en el marco teórico, actualmente el estado de deficiencia, insuficiencia y suficiencia de vitamina D se define únicamente por la concentración plasmática total de 25-hidroxivitamina D (61), la cual presenta una vida media mayor que el metabolito bioactivo 1,25 hidroxivitamina D. Sin embargo, existe evidencia creciente que muestra que al utilizar la fracción libre de 25-hidroxivitamina D y los niveles plasmáticos de la proteína ligadora de vitamina D (123,129) se disminuyen las diferencias entre las personas clasificadas como deficientes, insuficientes o suficientes de vitamina D, por lo que el análisis realizado en esta muestra costarricense es aplicable únicamente cuando se compara el nivel total de 25-hidroxivitamina D; pero puede que si se utilizaran otros parámetros los resultados se modifiquen.

Sería ideal controlar los modelos de regresión logística y lineal (Cuadros 5, 6, 7 y 8) por el estadio de función renal de las personas y el nivel plasmático de 1,25-hidroxivitamina D, pero para esta tesis no se contaba con estos datos. Las razones son: este estudio utiliza personas con DM2, las cuales pueden desarrollar nefropatía diabética y en consecuencia tener niveles de 1,25-hidroxivitamina D que no se esperarían según la reserva plasmática de 25-hidroxivitamina D, además de que los niveles bajos de 1,25-hidroxivitamina D se asocian con mayor riesgo de nefropatía diabética y de muerte (64–66). En una etapa posterior se recomienda realizar la cuantificación de 1,25-hidroxivitamina D, la cual se podría efectuar por espectrometría de masas (LC/MS) en el Centro de Investigación en Productos Naturales (CIPRONA), Universidad de Costa Rica con el equipo LC/MS SYNAPT y con el protocolo descrito por Wan *et al* (136), el cual se detalla en el Anexo 5.

Las muestras de plasma utilizadas se encontraron almacenadas en condiciones de oscuridad y de -80 °C durante 2 – 6 años, sin haber sido descongeladas durante ese tiempo; por lo que la estabilidad de la molécula de 25-hidroxivitamina D podría representar un problema. Un estudio que determinó concentraciones seriadas de 25-hidroxivitamina D, por medio de un inmunoensayo automatizado

(Cobas E 411 de la compañía Roche), no detectó diferencias si la cuantificación se hacía en el tiempo cero o si se realizaba luego de centrifugar la muestra o almacenarla por 3 meses a -80 °C (137). Otro estudio no encontró diferencias en muestras de sangre completa, la fracción sérica y extractos de 25-hidroxivitamina D que fueron expuestos a distintas condiciones de luz, de temperatura y de tiempo de medición (máximo 1 mes), la cuantificación fue realizada por LC-MS/MS (138). El fabricante del método de electroquimioluminiscencia ARCHITECT - de la marca Abbott- mostró estabilidad de la molécula almacenada a -20°C por un año (99). Como indicador de estabilidad, se hizo la cuantificación dos veces de 3 muestras del estudio elegidas al azar: la medición 1, se realizó luego de descongelar la muestra que se encontraba a -80 °C y la medición 2, se efectuó del mismo vial que la medición 1 pero 6 meses después, y luego de descongelarse por segunda vez desde -80 °C. La diferencia entre mediciones varió desde 0,10 ng/mL hasta 3,6 ng/mL, lo que se podría considerar poca variación (anexo 6, Cuadro 23).

En cuanto al análisis de datos genéticos, no fue posible realizar los modelos de regresión utilizando los haplotipos de cada sujeto como variable, ya que el programa PLINK 1,7 mostró inconsistencias en los resultados y la versión PLINK 1,9 no incluye los comandos relacionados a --hap-logistic y --hap-linear. Este análisis podría realizarse posteriormente con el uso del programa BEAGLE 5,1 (<https://faculty.washington.edu/browning/beagle/beagle.html>).

Finalmente, este estudio es completamente descriptivo y se basa en una muestra específica en un momento dado. La posible asociación encontrada entre los niveles de 25-hidroxivitamina D y el riesgo de DM2, así como la asociación de los alelos rs4588 y rs3755967 con los niveles bajos de 25-hidroxivitamina D plasmáticos, deberían ser confirmados en grupos independientes, con el fin de asegurar la reproducibilidad y la robustez de la asociación de estos alelos con el riesgo de DM2 en la población urbana costarricense a la que pertenecen las muestras.

Conclusiones

Esta tesis mostró que los niveles plasmáticos de 25-hidroxivitamina D podrían asociarse con la DM2 en la población urbana costarricense. Sin embargo, el impacto que produce la deficiencia e insuficiencia de 25-hidroxivitamina D en la génesis de DM2 es menor que el que producen los factores de riesgo como el sobrepeso, la obesidad o la HTA.

Además, el alelo T de rs4588 y el alelo A de rs3755967, ambos SNPs en el gen *GC*, se asociaron con disminución del nivel plasmático de 25-hidroxivitamina D. El alelo de riesgo del polimorfismo rs4588, según la literatura revisada, produce en la proteína GC características biocinéticas que disminuyen la afinidad de dicha proteína por los metabolitos de vitamina D. El SNP rs3755967 es intrónico y su función es desconocida, pero este SNP se encuentra en desequilibrio de ligamiento con el polimorfismo rs4588, por lo que la asociación de rs3755967 con los bajos niveles de 25-hidroxivitamina D podría estar condicionada por este hecho. Estos SNPs no se asociaron con la DM2, lo que muestra que el tener estos alelos no es suficiente para el desarrollo de DM2, ya que esta enfermedad es producto de un proceso complejo y por lo general prolongado en el que participan varios factores de riesgo.

En población costarricense con DM2 este es el primer estudio realizado en el que se cuantificó la 25-hidroxivitamina D plasmática. Se determinó que en la muestra hubo mayor cantidad de personas con los niveles plasmáticos de 25-hidroxivitamina D en un rango inadecuado que en rango adecuado. Estos resultados no pudieron ser comparados con otras publicaciones sobre los niveles plasmáticos de 25-hidroxivitamina D en la población costarricense porque existen diferencias en la muestra y en la metodología entre los estudios. Es decir, el estado de vitamina D en la población costarricense es desconocido.

Al valorar los niveles plasmáticos de 25-hidroxivitamina D es necesario tomar en cuenta la edad, el IMC, los triglicéridos, la glicemia en ayunas, la HbA1C y la PAS ya que estas variables correlacionan de forma negativa con los niveles plasmáticos de 25-hidroxivitamina D en los sujetos de esta muestra.

Finalmente, este trabajo enriquece la caracterización de las personas diabéticas en Costa Rica y contribuye con la investigación de los factores que podrían volver susceptible a dicha población al desarrollo de DM2 y a la creciente prevalencia de DM2 que muestra el país. Exploró un factor de riesgo para DM2 como lo son los bajos niveles de 25-hidroxivitamina D, a pesar que en la patogenia de DM2 no tiene un impacto mayor o igual que los factores de riesgo, evidencia que la deficiencia e insuficiencia de 25-hidroxivitamina D es frecuente en la población diabética y no diabética. Por tanto, esta tesis abre un espacio para investigar cuál es el estado de las personas costarricenses en cuanto a los niveles plasmáticos de vitamina D.

Referencias

1. Christakos S, Dhawan P, Verstuyf A, Verlinden L, Carmeliet G. Vitamin D: metabolism, molecular mechanism of action, and pleiotropic effects vitamin D analogs. *Physiol Rev.* 2016;96:365–408.
2. Pilz S, Verheyen N, Gröbler MR, Tomaschitz A, März W. Vitamin D and cardiovascular disease prevention. *Nat Rev Cardiol.* 2016 May 6;
3. Scragg R, Sowers M, Bell C. Serum 25-hydroxyvitamin D, Diabetes and Ethnicity in the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Diabetes Care.* 2004;27(12):2813–8.
4. Kayaniyl S, Retnakaran R, Harris S, Vieth R, Knight J, Gerstein H, et al. Association of Vitamin D with Insulin Resistance and beta-Cell Dysfunction in Subjects at Risk for Type 2 Diabetes. *Diabetes Care.* 2010;33(6):6–8.
5. Mansuri S, Badawi A, Kayaniyl S, Cole DE, Harris SB, Mamakeesick M, et al. Associations of circulating 25(OH)D with cardiometabolic disorders underlying type 2 diabetes mellitus in an Aboriginal Canadian community. *Diabetes Res Clin Pract.* 2015;109(2):440–9.
6. Gobbo LC Del, Song Y, Dannenbaum DA, Dewailly E, Egeland GM. Serum 25-Hydroxyvitamin D Is not Associated with Insulin Resistance or Beta Cell Function in Canadian Cree. *J Nutr.* 2011;141(2):290–5.
7. Marques-vidal P, Vollenweider P, Guessous I, Henry H, Boulat O. Serum Vitamin D Concentrations Are Not Associated with Insulin Resistance in Swiss. *J Nutr.* 2015;145(9):2117–22.
8. Farrokhan A, Raygan F, Bahmani F, Talari HR, Esfandiari R, Esmailzadeh A, et al. Long-Term Vitamin D Supplementation Affects Metabolic Status in Vitamin D – Deficient Type 2 Diabetic Patients with Coronary Artery Disease. *J Nutr.* 2017;25.
9. Wu C, Qiu S, Zhu X, Li L. Vitamin D supplementation and glycemic control in type 2 diabetes patients: A systematic review and meta-analysis. *Metabolism.* 2017;73:67–76.
10. Pittas AG, Dawson-Hughes B, Sheehan P, Ware JH, Knowler WC, Aroda VR, et al. Vitamin D Supplementation and Prevention of Type 2 Diabetes. *N Engl J Med.* 2019;381(6):520–30.
11. Jorde R, Sollid ST, Svartberg J, Schirmer H, Joakimsen RM, Njølstad I, et al. Vitamin D 20 000 IU per week for five years does not prevent progression from prediabetes to diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2016;101(4):1647–55.
12. Kawahara T, Suzuki G, Inazu T, Mizuno S, Kasagi F, Okada Y, et al. Rationale and design of

- Diabetes Prevention with active Vitamin D (DPVD): A randomised, double-blind, placebo-controlled study. *BMJ Open*. 2016;6(7):1–7.
13. Kawahara T. Eldecalcitol, a Vitamin D Analog, for Diabetes Prevention in Impaired Glucose Tolerance (DPVD Study). Vol 67. *Diabetes*. 2018.
 14. Engelman CD, Fingerlin TE, Langefeld CD, Hicks PJ, Rich SS, Wagenknecht LE, et al. Genetic and environmental determinants of 25-hydroxyvitamin D and 1,25-dihydroxyvitamin D levels in Hispanic and African Americans. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93(9):3381–8.
 15. Jorde R, Schirmer H, Wilsgaard T, Joakimsen RM, Mathiesen EB, Njølstad I, et al. Polymorphisms related to the serum 25-Hydroxyvitamin D level and risk of Myocardial infarction, diabetes, cancer and mortality. The Tromsø study. *PLoS One*. 2012;7(5):1–10.
 16. Ahn J, Yu K, Stolzenberg-Solomon R, Claire Simon K, McCullough ML, Gallicchio L, et al. Genome-wide association study of circulating vitamin D levels. *Hum Mol Genet*. 2010;19(13):2739–45.
 17. Mitri J, Muraru MD, Pittas AG. Vitamin D and type 2 diabetes: A systematic review. *Eur J Clin Nutr*. 2011;65(9):1005–15.
 18. Wong McClure R. Vigilancia de los factores de riesgo cardiovascular. Segunda encuesta, 2014. EDNASS-CCSS. 2016. 1–92 p.
 19. Wong-McClure R, Gregg EW, Barcelo A, Sanabria-Lopez L, Lee K, Abarca-Gomez L, et al. Prevalence of diabetes and impaired fasting glucose in Costa Rica: Costa Rican National Cardiovascular Risk Factors Survey, 2010. *J Diabetes*. 2015;8(5):686–92.
 20. Ministerio de salud Costa Rica. Análisis de la Situación de Salud 2018. 2019;1–93.
 21. Campos H, Willett WC, Peterson RM, Siles X, Bailey SM, Wilson PWF, et al. Nutrient Intake Comparisons Between Framingham and Rural and Urban Puriscal, Costa Rica. *Arter Thromb*. 1991;11(4):1089–99.
 22. Campos H, Mata L, Siles X, Vives M, Ordovas JM, Schaefer EJ, et al. Prevalence of Cardiovascular Risk Factors in Rural and Urban Costa Rica. *Circulation*. 1992;85(2):648–59.
 23. Laclé-Murray A, Valero-Juan L. Incidencia de diabetes tipo 2 en un área urbano marginal de Costa Rica. *Acta Med Costarric*. 2008;50(1):29–34.
 24. Gómez G, Ramírez A, Sheik A, Chinnock A, Nogueira A. Prevalence of inadequate micronutrient intake among urban Costa Rican population: results from the Latin American

- Study of Nutrition and Health (ELANS). In: 21^o International Congress of Nutrition. Buenos Aires; 2017.
25. Ministerio de Salud. Análisis de Situación de Salud Costa Rica, 2014. Ministerio de Salud. 2014. 1–193 p.
 26. Ministerio de salud Costa Rica. Plan Nacional de Salud 2016 - 2020. Costa Rica; 2016.
 27. Maestro B, Dávila N, Carranza MC, Calle C. Identification of a Vitamin D response element in the human insulin receptor gene promoter. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2003;84(2–3):223–30.
 28. Wolden-kirk H, Overbergh L, Gysemans C, Brusgaard K, Naamane N. Unraveling the effects of 1,25 (OH)₂ D₃ on global gene expression in pancreatic islets. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2013;136:68–79.
 29. Zeitz U, Weber K, Soegiarto DW, Wolf E, Balling R, Reinhold G, et al. Impaired insulin secretory capacity in mice lacking a functional vitamin D receptor. *FASEB J*. 2003;17(3):509–11.
 30. Lieberherr LE, Erben RG, Soegiarto DW, Weber K, Zeitz UTE, Gniadecki R, et al. Deletion of Deoxyribonucleic Acid Binding Domain of the Vitamin D Receptor Abrogates Genomic and Nongenomic Functions of Vitamin D. *Mol Endocrinol*. 2002;16(7):1524–37.
 31. Gysemans C, Cardozo A, Callewaert H, Giulietti A, Hulshagen L, Bouillon R, et al. 1-25-dihydroxyvitamin D₃ Modulates Expression of Chemokines and Cytokines in Pancreatic Islets: Implications for Prevention of Diabetes in Nonobese Diabetic Mice. *Endocrinology*. 2005;146(4):1956–64.
 32. Patel TP, Rawal K, Bagchi AK, Akolkar G, Bernardes N, Dias D da S, et al. Insulin resistance: an additional risk factor in the pathogenesis of cardiovascular disease in type 2 diabetes. *Heart Fail Rev*. 2016;21(1):11–23.
 33. Kautzky-Willer A, Harreiter J, Pacini G. Sex and gender differences in risk, pathophysiology and complications of type 2 diabetes mellitus. *Endocr Rev*. 2016;37(3):278–316.
 34. Roselló-Araya M. Prevalencia de diabetes tipo 2, intolerancia a la glucosa y diabetes provisional en El Guarco, Cartago. Vol. 24, *Revista Costarricense de Ciencias Médicas*. 2003. p. 15–24.
 35. Jaacks LM, Siegel KR, Gujral UP, Narayan KMV. Type 2 diabetes: A 21st century epidemic.

- Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. 2016;30(3):331–43.
36. Pitkänen N, Juonala M, Rönnemaa T, Sabin MA, Hutri-Kähönen N, Kahonen M, et al. Role of conventional childhood risk factors versus genetic risk in the development of type 2 diabetes and impaired fasting glucose in adulthood: The cardiovascular risk in Young Finns study. *Diabetes Care*. 2016;39(8):1393–9.
 37. Moya-Zeledón D, Madrigal-Sánchez J. Polimorfismo inserción/delección del gen de la enzima convertidora de angiotensina y su asociación con algunas complicaciones en pacientes con diabetes mellitus tipo 2. *Acta Med Costarric*. 2012;54(2):102–8.
 38. Qi L, Ma J, Qi Q, Hartiala J, Allayee H, Campos H. Genetic risk score and risk of myocardial infarction in hispanics. *Circulation*. 2011;123(4):374–80.
 39. Sotos-Prieto M, Baylin A, Campos H, Qi L, Mattei J. Lifestyle Cardiovascular Risk Score, Genetic Risk Score, and Myocardial Infarction in Hispanic/Latino Adults Living in Costa Rica. *J Am Heart Assoc*. 2016;5(12):1–8.
 40. Asano L, Watanabe M, Ryoden Y, Usuda K, Yamaguchi T, Khambu B, et al. Vitamin D Metabolite , 25-Hydroxyvitamin D , Regulates Lipid Metabolism by Inducing Degradation of SREBP / SCAP. *Cell Chem Biol*. 2017;24:1–11.
 41. Yin Y, Yu Z, Xia M, Luo X, Lu X, Ling W. Vitamin D attenuates high fat diet – induced hepatic steatosis in rats by modulating lipid metabolism. *Eur J Clin Invest*. 2012;42(11):1189–96.
 42. Berridge MJ. Biochemical and Biophysical Research Communications Vitamin D cell signalling in health and disease. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015;460(1):53–71.
 43. Prosser DE, Jones G. Enzymes involved in the activation and inactivation of vitamin D. *Trends Biochem Sc*. 2004;29(12):664–73.
 44. Zhu J, Deluca HF. Vitamin D 25-hydroxylase – Four decades of searching , are we there yet? *Arch Biochem Biophys*. 2012;523(1):30–6.
 45. Cheng JB, Levine MA, Bell NH, Mangelsdorf DJ, Russell DW. Genetic evidence that the human CYP2R1 enzyme is a key vitamin D 25-hydroxylase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(20):7711–7515.
 46. Zhu JG, Ochalek JT, Kaufmann M, Jones G, Deluca HF. CYP2R1 is a major, but not exclusive, contributor to 25-hydroxyvitamin D production in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(39):15650–5.

47. Bland R, Walker EA, Hughes S V, Stewart PM, Hewison M. Hydroxylase in a Transformed Human Proximal Tubule Cell Line: Evidence for Direct Regulation of Vitamin D Metabolism by Calcium. *Endocrinology*. 1999;140(5):2027–34.
48. Díaz L, Sánchez I, Ávila Eu, Halhali A, Vilchis F, Larrea F. Identification of 25-hydroxyvitamin D3 1- α -hydroxylase gene transcription product in cultures of human syncytiotrophoblast cells. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000;85(7):2543–9.
49. Wamberg L, Christiansen T, Paulsen SK, Fisker S, Rask P, Rejnmark L, et al. Expression of vitamin D-metabolizing enzymes in human adipose tissue — the effect of obesity and diet-induced weight loss. *Int J Obes*. 2012;37(5):651–7.
50. Henry HL, Luntao EM. Interactions between Intracellular Signals Involved in the Regulation of 25-Hydroxyvitamin D 3 Metabolism. *Endocrinology*. 1989;124(5):2228–34.
51. Chang M, Shizaki K, Huro-o M, Moe O. Fibroblast growth factor 23 and Klotho: physiology and pathophysiology of an endocrine network of mineral metabolism. *Annu Rev Physiol*. 2013;75:503–33.
52. Nguyen-yamamoto L, Karaplis AC, Arnaud RS, Goltzman D. Fibroblast Growth Factor 23 Regulation by Systemic and Local Osteoblast-Synthesized. *J Am Soc Nephrol*. 2017;28(2):586–97.
53. He J. Micro RNA - 550a interferes with vitamin D metabolism in peripheral B cells of patients with diabetes. *Cell Biochem Funct*. 2016;34(8):640–6.
54. Chun RF. New perspectives on the vitamin D binding protein. *Cell Biochem Funct*. 2012;30(6):445–56.
55. Nykjaer A, Dragun D, Walther D, Vorum H, Jacobsen C, Herz J, et al. An Endocytic Pathway Essential for Renal Uptake and Activation of the Steroid 25-(OH) Vitamin D3. *Cell*. 1999;96:507–15.
56. Torremadé N, Bozic M, Goltzman D, Fernandez E, Valdivielso J. Effects of the Administration of 25 (OH) Vitamin D3 in an Experimental Model of Chronic Kidney Disease in Animals Null for 1- α -hydroxylase. *PLoS One*. 2017;12(1):1–14.
57. Nemeris I, Dormanens MC, Hammondn MW, Okamuran WH, Norman AW. Identification of a Specific Binding Protein for 1,25-dihydroxyvitamin D3 in Basal-Lateral Membranes of Chicks: Intestinal Epithelium and Relationship to Transcaltachia. *J Biol Chem*.

- 1994;269(38):23750–6.
58. Nemere I, Schwartz Z, Pedrozo H, Sylvia VL, Dean DD, Boyan BD. Identification of a membrane receptor for 1,25-dihydroxyvitamin D₃ which mediates rapid activation of protein kinase C. *J Bone Min Res*. 1998;13(9):1353–9.
 59. Chen J, Doroudi M, Cheung J, Grozier AL, Schwartz Z, Boyan BD. Plasma membrane Pdia3 and VDR interact to elicit rapid responses to 1 α ,25(OH)₂ vitamin D₃. *Cell Signal*. 2013;25(12):2362–673.
 60. Hii CS, Ferrante A. The Non-Genomic Actions of Vitamin D. *Nutrients*. 2016;8(3):1–14.
 61. Holick MF, Binkley NC, Bischoff-ferrari HA, Gordon CM, Hanley DA, Heaney RP, et al. Evaluation, Treatment , and Prevention of Vitamin D Deficiency: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96(7):1911–30.
 62. Hollis BW. Assessment and Interpretation of Circulating 25-Hydroxyvitamin D and 1,25-Dihydroxyvitamin D in the Clinical Environment. *Endocrinol Metab Clin N Am*. 2010;39:271–86.
 63. Holick M. Vitamin D status: measurement, interpretation, and clinical application. *Ann Epidemiol*. 2009;19(2):73–8.
 64. Nakashima A, Yokoyama K, Yokoo T, Urashima M. Role of vitamin D in diabetes mellitus and chronic kidney disease. *World J Diabetes*. 2016;7(5):89.
 65. Kendrick J, Cheung A, Kaufman J, Greene T, Roberts W, Smiths G, et al. Associations of plasma 25-hydroxivitamin D and 1,25 dihydroxyvitamin D concentrations with death and progression to maintenance dialysis in patients with advance kidney disease. *Am J Kidney Dis*. 2012;60(4):567–75.
 66. Derakhshanian H, Shab-Bidar S, Speakman JR, Nadimi H, Djafarian K. Vitamin D and diabetic nephropathy: A systematic review and meta-analysis. *Nutrition*. 2015;31(10):1189–94.
 67. Vanherwegen AS, Gysemans C, Mathieu C. Regulation of Immune Function by Vitamin D and Its Use in Diseases of Immunity. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2017;46(4):1061–94.
 68. Robert, Sowers Ms, Bell C. Serum 25-hydroxyvitamin D, ethnicity and Blood Pressure in the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Am J Hypertens*. 2007;20(7):713–9.
 69. Scragg RK, Camargo CA, Simpson RU. Relation of Serum 25-Hydroxyvitamin D to Heart Rate and Cardiac Work (from the National Health and Nutrition Examination Surveys). *Am J*

- Cardiol. 2010;105(1):122–8.
70. Matsuda M, DeFronzo R. Insulin Sensitivity Indices Obtained From Comparison with the euglycemic insulin clamp. *Diabetes Care*. 1999;22(9):1462–70.
 71. Gutch M, Kumar S, Razi SM, Gupta KK, Gupta A. Assessment of insulin sensitivity/resistance. *Indian J Endocrinol Metab*. 2015;19(1):160–4.
 72. Retnakaran R, Qi Y, Goran MI, Hamilton JK. Metabolism Evaluation of proposed oral disposition index measures in relation to the actual disposition index. *Diabet Med*. 2009;26(12):1198–203.
 73. Cordell HJ, Clayton DG. Genetic Epidemiology 3 - Genetic association studies. *Lancet*. 2005;366(9491):1121–31.
 74. Gibson G. Rare and common variants: twenty arguments. *Nat Publ Gr*. 2012;13(2):135–45.
 75. Iturrieta-zuazo I, Walter S, Ana NDEL. Aleatorización mendeliana: presente y futuro de los estudios epidemiológicos en cardiología. *Rev Esp Cardiol*. 2015;68(2):87–91.
 76. Smith G. Mendelian Randomization for Strengthening Causal Inference in Observacional Studies: Application to Gene x Enviroment Interactions. *Perspect Psychol Sci*. 2010;5(5):527–45.
 77. Neeland IJ, Kozlitina J. Mendelian Randomization: Using Natural Genetic Variation to Assess the Causal Role of Modifiable Risk Factors in Observational Studies. *Circulation*. 2017;135:755–9.
 78. Segura-wang M, Raventós H, Escamilla M, Barrantes R, Biología E De, Rica UDC, et al. Assessment of genetic ancestry and population substructure in Costa Rica by analysis of individuals with a familial history of mental disorder. *Ann Hum Genet*. 2010;74(6):516–24.
 79. Sánchez RC. Ancestry Informative Markers Clarify the Regional Admixture Variation in the Costa Rican Population Ancestry Informative Markers Clarify the Regional Admixture Variation in the Costa Rican Population. *Hum Biol*. 2014;85(5):721–40.
 80. Engelman CD, Meyers KJ, Ziegler JT, Taylor KD, Palmer ND, Haffner SM, et al. Genome-wide association study of vitamin D concentrations in Hispanic Americans: The IRAS Family Study. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2010;122(4):186–92.
 81. Wang T, Zhang F, Richards B, Kestenbaum B, van Meurs J, Berry D, et al. Common genetic determinants of vitamin D insufficiency: genome-wide association study. *Lancet*.

- 2010;376(9736):180–8.
82. Afzal S, Brøndum-Jacobsen P, Bojesen SE, Nordestgaard BG. Vitamin D concentration, obesity, and risk of diabetes: A mendelian randomisation study. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2014;2(4):298–306.
 83. Ye Z, Sharp SJ, Burgess S, Scott RA, Imamura F, Langenberg C, et al. Association between circulating 25-hydroxyvitamin D and incident type 2 diabetes: A mendelian randomisation study. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2015;3(1):35–42.
 84. Legarth C, Grimm D, Wehland M, Bauer J, Krüger M. The impact of vitamin d in the treatment of essential hypertension. *Int J Mol Sci.* 2018;19(2).
 85. Zhang W, Chen L, Zhang L, Xiao M, Ding J, Goltzman D, et al. Administration of exogenous 1,25(OH)2D3 normalizes overactivation of the central renin-angiotensin system in 1 α (OH)ase knockout mice. *Neurosci Lett.* 2015;588:184–9.
 86. Zhou C, Lu F, Cao K, Xu D, Goltzman D, Miao D. Calcium-independent and 1,25(OH)2D3-dependent regulation of the renin-angiotensin system in 1 α -hydroxylase knockout mice. *Kidney Int.* 2008;74(2):170–9.
 87. Pilz S, Gaksch M, Kienreich K, Gröbler M, Verheyen N, Fahrleitner-Pammer A, et al. Effects of Vitamin D on Blood Pressure and Cardiovascular Risk Factors: A Randomized Controlled Trial. *Hypertension.* 2015;65(6):1195–201.
 88. Bernini G, Carrara D, Bacca A, Carli V, Virdis A, Rugani I, et al. Effect of acute and chronic vitamin D administration on systemic renin angiotensin system in essential hypertensives and controls. *J Endocrinol Invest.* 2013;36(4):216–20.
 89. Beveridge LA, Struthers AD, Khan F, Jorde R, Scragg R, Macdonald HM, et al. Effect of vitamin D supplementation on blood pressure a systematic review and meta-analysis incorporating individual patient data. *JAMA Intern Med.* 2015;175(5):745–54.
 90. Carrara D, Bruno RM, Bacca A, Taddei S, Duranti E, Ghiadoni L, et al. Cholecalciferol treatment downregulates renin–angiotensin system and improves endothelial function in essential hypertensive patients with hypovitaminosis D. *J Hypertens.* 2016;34(11):2199–205.
 91. Carrara D, Bernini M, Bacca A, Rugani I, Duranti E, Virdis A, et al. Cholecalciferol administration blunts the systemic renin-angiotensin system in essential hypertensives with hypovitaminosis D. *JRAAS - J Renin-Angiotensin-Aldosterone Syst.* 2014;15(1):82–7.

92. Cremer A, Tambosco C, Corcuff J-B, Boulestreau R, Gaillard P, Lainé M, et al. Investigating the association of vitamin D with blood pressure and the renin–angiotensin–aldosterone system in hypertensive subjects: a cross-sectional prospective study. *J Hum Hypertens*. 2018;32(2):114–21.
93. Poss J, Mahfoud F, Ukena C, Esler MD, Schlaich M, Hering D, et al. Association of vitamin D status and blood pressure response after renal denervation. *Clin Res Cardiol*. 2014;103(1):41–7.
94. Taheri S, Asim M, Al Malki H, Fituri O, Suthanthiran M, August P. Intervention using vitamin D for elevated urinary albumin in type 2 diabetes mellitus (IDEAL-2 Study): study protocol for a randomised controlled trial IDEAL-2 Study Team. *Trials*. 2018;19(230):1–10.
95. Carlberg C. Molecular and Cellular Endocrinology Molecular endocrinology of vitamin D on the epigenome level. *Mol Cell Endocrinol*. 2017;1–8.
96. Nimitphong H, Holick MF, Fried SK, Lee M. Promote the Differentiation of Human Subcutaneous Preadipocytes. *PLoS One*. 2012;7(12):1–10.
97. Wong KE, Szeto FL, Zhang W, Ye H, Kong J, Zhang Z, et al. Involvement of the vitamin D receptor in energy metabolism: regulation of uncoupling proteins. *Am J Physiol - Endocrinol Metab*. 2009;296(4):820–8.
98. Kong J, Li YC. Molecular mechanism of 1,25-dihydroxyvitamin D3 inhibition of adipogenesis in 3T3-L1 cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2006;290(5):916–24.
99. Abbott Laboratories. Architect 25-OH Vitamin D. 2016.
100. American Diabetes Association. 2. Classification and diagnosis of diabetes: Standards of medical care in diabetes - 2019. *Diabetes Care*. 2019;42(Supplement 1):S13–28.
101. Roden M, Shulman GI. The integrative biology of type 2 diabetes. *Nature*. 2019;576(7785):51–60.
102. Henning R. Type-2 diabetes mellitus and cardiovascular disease. *Future Cardiol*. 2018;14(6):491–509.
103. Pearson ER. Type 2 diabetes: a multifaceted disease. *Diabetologia*. 2019;62(7):1107–12.
104. Sacerdote A, Dave P, Lokshin V, Bahtiyar G. Type 2 Diabetes Mellitus, Insulin Resistance, and Vitamin D. *Curr Diab Rep*. 2019;19(10).
105. Jimenez-Montero J, Gamboa Gamboa T, Abarca Soto G. Prevalence of 25-hydroxyvitamin D

- deficiency in healthy personnel from an academic institution of an urban area in Costa Rica. *Res Reports Endocr Disord*. 2015;5:135.
106. Chen-Ku C, Jimenez M, Ulate L. Original Hipovitaminosis D en Costa Rica , reporte inicial. *Acta Med Costarric*. 2012;54(3):146–51.
 107. Montero-Arias F, Sedó-Mejía G, Ramos-Esquivel A. Vitamin D insufficiency and asthma severity in adults from Costa Rica. *Allergy, Asthma Immunol Res*. 2013;5(5):283–8.
 108. Brehm JM, Celedón JC, Soto-Quiros ME, Avila L, Hunninghake GM, Forno E, et al. Serum vitamin D levels and markers of severity of childhood asthma in Costa Rica. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009;179(9):765–71.
 109. Castro NA, Holst I. Niveles séricos de 25-hidroxivitamina D3 en población estudiantil de la Universidad de Costa Rica. Universidad de Costa Rica; 2015.
 110. Brehm JM, Celedón JC, Soto-Quiros ME, Avila L, Hunninghake GM, Forno E, et al. Serum vitamin D levels and markers of severity of childhood asthma in Costa Rica. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009;179(9):765–71.
 111. Ceglia L, Nelson J, Ware J, Alysandratos KD, Bray GA, Garganta C, et al. Association between body weight and composition and plasma 25-hydroxyvitamin D level in the Diabetes Prevention Program. *Eur J Nutr*. 2017;56(1):161–70.
 112. Migliaccio S, Di Nisio A, Mele C, Scappaticcio L, Savastano S, Colao A. Obesity and hypovitaminosis D: causality or casualty? *Int J Obes Suppl*. 2019;9(1):20–31.
 113. Carrelli A, Bucovsky M, Horst R, Cremers S, Zhang C, Bessler M, et al. Vitamin D Storage in Adipose Tissue of Obese and Normal Weight Women. *J Bone Miner Res*. 2017;32(2):237–42.
 114. Martinaityte I, Kamysheva E, Didriksen A, Jakobsen J, Jorde R. Vitamin D stored in fat tissue during a 5-year intervention affects serum 25-hydroxyvitamin d levels the following year. *J Clin Endocrinol Metab*. 2017;102(10):3731–8.
 115. Drincic AT, Armas LAG, Van Diest EE, Heaney RP. Volumetric dilution, rather than sequestration best explains the low vitamin D status of obesity. *Obesity*. 2012;20(7):1444–8.
 116. Oosterwerff MM, Eekhoff EMW, Van Schoor NM, Boeke AJP, Nanayakkara P, Meijnen R, et al. Effect of moderate-dose vitamin D supplementation on insulin sensitivity in vitamin D-deficient non-Western immigrants in the Netherlands: A randomized placebo-controlled trial. *Am J Clin Nutr*. 2014;100(1):152–60.

117. Moreira-Lucas TS, Duncan AM, Rabasa-Lhoret R, Vieth R, Gibbs AL, Badawi A, et al. Effect of vitamin D supplementation on oral glucose tolerance in individuals with low vitamin D status and increased risk for developing type 2 diabetes (EVIDENCE): A double-blind, randomized, placebo-controlled clinical trial. *Diabetes, Obes Metab.* 2017;19(1):133–41.
118. Scott D, Mousa A, Naderpoor N, de Courten MPJ, Scragg R, de Courten B. Vitamin D supplementation improves waist-to-hip ratio and fasting blood glucose in vitamin D deficient, overweight or obese Asians: A pilot secondary analysis of a randomised controlled trial. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2019;186(July 2018):136–41.
119. Forouhi NG, Menon RK, Sharp SJ, Mannan N, Timms PM, Martineau AR, et al. Effects of vitamin D2 or D3 supplementation on glycaemic control and cardiometabolic risk among people at risk of type 2 diabetes: Results of a randomized double-blind placebo-controlled trial. *Diabetes, Obes Metab.* 2016;18(4):392–400.
120. Mousa A, Naderpoor N, De Courten MPJ, Teede H, Kellow N, Walker K, et al. Vitamin D supplementation has no effect on insulin sensitivity or secretion in Vitamin D-deficient, overweight or obese adults: A randomized placebo-controlled trial. *Am J Clin Nutr.* 2017;105(6):1372–81.
121. Niroomand M, Fotouhi A, Irannejad N, Hosseinpanah F. Does high-dose vitamin D supplementation impact insulin resistance and risk of development of diabetes in patients with pre-diabetes? A double-blind randomized clinical trial. *Diabetes Res Clin Pract.* 2019;148(2):1–9.
122. Chun RF, Peercy BE, Orwoll ES, Nielson CM, Adams JS, Hewison M. Vitamin D and DBP: The free hormone hypothesis revisited. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2014;144PA:132–7.
123. Powe CE, Evans MK, Wenger J, Zonderman AB, Berg AH, Nalls M, et al. Vitamin D-binding protein and vitamin D status of black Americans and white Americans. *N Engl J Med.* 2013;369(21):1991–2000.
124. Speeckaert M, Huang G, Delanghe JR, Taes YEC. Biological and clinical aspects of the vitamin D binding protein (Gc-globulin) and its polymorphism. *Clin Chim Acta.* 2006;372(1–2):33–42.
125. Cleve H, Constans J. The Mutants of the Vitamin-D-Binding Protein: More than 120 Variants of the GC/DBP System. *Vox Sang.* 1988;54(4):215–25.
126. Arnaud J, Constans J. Affinity differences for vitamin D metabolites associated with the

- genetic isoforms of the human serum carrier protein (DBP). *Hum Genet.* 1993;92:183–8.
127. Al-Daghri NM, Mohammed AK, Bukhari I, Rikli M, Abdi S, Ansari MGA, et al. Efficacy of vitamin D supplementation according to vitamin D-binding protein polymorphisms. *Nutrition.* 2019;63–64:148–54.
 128. Sinotte M, Diorio C, Bérubé S, Pollak M, Brisson J. Genetic polymorphisms of the vitamin D binding protein and plasma concentrations of 25-hydroxyvitamin D in premenopausal women. *Am J Clin Nutr.* 2009;89(2):634–40.
 129. Sollid ST, Hutchinson MYS, Berg V, Fuskevåg OM, Figenschau Y, Thorsby PM, et al. Effects of Vitamin D binding protein phenotypes and Vitamin D supplementation on serum total 25(OH)D and directly measured free 25(OH)D. *Eur J Endocrinol.* 2016;174(4):445–52.
 130. Echouffo-Tcheugui JB, Niiranen TJ, McCabe EL, Jain M, Vasan RS, Larson MG, et al. Lifetime prevalence and prognosis of prediabetes without progression to diabetes. *Diabetes Care.* 2018;41(7):117–8.
 131. Brannick B, Dagogo-Jack S. Prediabetes and Cardiovascular Disease: Pathophysiology and Interventions for Prevention and Risk Reduction. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2018;47(1):33–50.
 132. Di Pino A, Urbano F, Piro S, Purrello F, Rabuazzo AM. Update on pre-diabetes: Focus on diagnostic criteria and cardiovascular risk. *World J Diabetes.* 2016;7(18):423.
 133. Huang Y, Cai X, Mai W, Li M, Hu Y. Association between prediabetes and risk of cardiovascular disease and all cause mortality: Systematic review and meta-analysis. *BMJ.* 2016;355.
 134. American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus American Diabetes Association. *Diabetes Care.* 2011;34(Supplement 1):S62–9.
 135. World Health Organization. Use of glycated haemoglobin (HbA1c) in the diagnosis of diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract.* 2011;93(3):299–309.
 136. Wan D, Yang J, Barnych B, Hwang SH, Lee KSS, Cui Y, et al. A new sensitive LC/MS/MS analysis of vitamin D metabolites using a click derivatization reagent, 2-nitrosopyridine. *J Lipid Res.* 2017;58(4):798–808.
 137. Colak A, Toprak B, Dogan N, Ustuner F. Effects of sample type, centrifugation and storage conditions on vitamin D concentration. *Biochem Medica.* 2013;23(3):321–5.
 138. Albahrani AA, Rotarou V, Roche PJ, Greaves RF. Analyte stability during the total testing

process: Studies of vitamins A, D and E by LC-MS/MS. Clin Chem Lab Med. 2016;54(10):1609–18.

Anexo 1. Aprobación del Comité Ético Científico de la Universidad de Costa Rica



VI Vicerrectoría de
Investigación

25 de agosto de 2017
VI-6467-2017

Georgina Gómez
Investigadora
Escuela de Medicina

El Comité Ético Científico (CEC) en su sesión No.72, celebrada el 9 de agosto de 2017 sometió a consideración el Proyecto de investigación "Niveles Plasmáticos de vitamina D, Polimorfismos en su vía de acción y su relación con el riesgo de Diabetes tipo 2 en una población urbana de Costa Rica".

Después del análisis y la deliberación correspondientes, el Comité acuerda:

Acuerdo N°6: Declarar aprobado el proyecto de investigación "Niveles Plasmáticos de vitamina D, Polimorfismos en su vía de acción y su relación con el riesgo de Diabetes tipo 2 en una población urbana de Costa Rica" de la investigadora principal Georgina Gómez.

Quedamos en la entera disposición de colaborar ante cualquier consulta.
Sin más por el momento, se suscribe cordialmente,

M.Sc. Alfonso Chacón Mata
Presidente Comité Ético Científico



dha
C.c. Dra. Lizbeth Salazar Sánchez, Directora Escuela de Medicina
M.Sc. Dario Hernández Gestor de proyectos VI
Archivo/consecutivo.



Anexo 2. Genotipo de SNPs- Diferenciación alélicas- qPCR TaqMan

Materiales necesarios:

- TaqMan™ Genotyping o Universal PCR Master Mix, no AmpErase™ UNG. Marca: Applied Biosystems™. # Catálogo: 4371353 o 4324018.
- Platos: MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reaction Plate, 0.1 mL. Marca: Applied Biosystems™. Presentación para 10 placas. # Catálogo: 4324018.
- Coberturas plásticas: MicroAmp™ Optical Adhesive Film. Marca: Applied Biosystems™. Presentación para 25 cobertores ópticos. # Catálogo: 4360954.
- Sondas TaqMan - TaqMan™ SNP Genotyping Assay.
- Micropipetas de 10, 100, 200 y 1000 µL.
- Puntas plásticas estériles con filtro para micropipeta.
- Tubos para microcentrífuga de 600 y 1000 µL.
- Agua grado biología molecular.

Equipo necesario:

- Centrífuga.
- Nanodrop.
- Cabina de flujo laminar.
- StepOne Plus Real Time PCR System, Applied Biosystems™.

Cuantificación de ADN: Cuantificar el ADN por medio de Nanodrop a una longitud de onda de 260/280 nm, asegurarse de que se tiene mínimo 20 ng ADN por ensayo. Para las PCRs de esta tesis se utilizó 30 ng por ensayo, es decir 3 µL con una concentración de 10 ng/ µL.

Preparación de los platos y corrida:

1. Mantener en hielo los reactivos y las muestras.
2. Asegurarse de que el ADN está diluido en agua estéril.
3. Preparar el Master Mix como se indica en el cuadro 1.

Cuadro 1. Reactivos y volumen necesarios durante la realización de qPCR TaqMan.

Reactivo	µL/pozo
TaqMan™ Universal PCR Master Mix O TaqMan™ Genotyping PCR Master Mix	5 5,5
Sonda Taqman	0,5

Agua	1,5 o 1
ADN (Diluido 1/10 en agua estéril)	3
Total	10

4. Poner la cubierta plástica, evitar tocar el fondo y la parte superior de los pozos.
5. Centrifugar platos (1 *spin* rápido hasta 1000 rpm).
6. Guardar en el congelador hasta que pueda ser leído (máximo 2-3 días).
7. Realizar una lectura pre-PCR para determinar la fluorescencia presente antes de la corrida.
8. Realizar la corrida de la qPCR como se indica en el cuadro 2.

Cuadro 2. Parámetros necesarios para corrida de qPCR TaqMan.

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Activación de la polimerasa	95	10 minutos	1X
Denaturalización	95	15 segundos	40X
<i>Annealing</i> /Extensión	60	1 minuto	

9. Durante el análisis de la información, sustraer la fluorescencia determinada durante la lectura pre-PCR.

Anexo 3. Evaluación de la distribución Gaussiana de las variables continuas del estudio

Cuadro 18. Estadísticos descriptivos de edad, IMC, glicemia, HbA1C, colesterol total, HDL-C, LDL-C, VLDL, triglicéridos (triglic), PAS, PAD y 25-hidroxivitamina D de todos los participantes, Resultados de la prueba de normalidad Kolmogorov-Smirnov (KS).

	Edad	IMC	Glicemia	HbA1C	Colesterol total	HDL-C	LDL-C	VLDL-C	Triglic	PAS	PAD	25-hidroxivitamina D
n=	622	604	619	574	617	615	585	584	616	603	603	556
Valor mínimo	39	14,60	57	4,60	90,0	16,80	31,7	9	45	88	24	5,3
Percentil 25	55	25,30	91	5,60	174,5	33,60	97,15	23,6	119	119	69	18,9
Mediana	62	28,00	99	6,00	200,0	39,40	121,80	33,1	171	131	75	24,4
Percentil 75	69	31,60	130	7,30	231,0	45,90	148,40	43,95	230	144	82	29,5
Valor máximo	95	51,10	373	13,50	344,0	166,00	244,80	183,6	1078	205	170	52,0
Media	62,52	28,83	118,50	6,65	203,6	40,98	124,70	35,24	193,7	132,80	75,11	24,52
Desviación estándar	10,28	5,23	44,70	1,55	42,04	11,52	36,33	16,40	120,90	19,65	11,80	7,93
Error estándar	0,4121	0,2129	1,797	0,06476	1,693	0,4647	1,502	0,6786	4,871	0,8002	0,4807	0,3364
CI (95%) límite inferior	61,71	28,41	115	6,52	200,30	40,07	121,7	33,91	184,2	131,2	74,16	23,85
CI (95%) límite superior	63,33	29,25	122,1	6,78	206,90	41,89	127,6	36,57	203,3	134,3	76,05	25,18
Prueba KS												
Distancia KS	0,05841	0,08959	0,2004	0,2148	0,04399	0,09039	0,03652	0,08612	0,145	0,05239	0,06233	0,03639
Valor p	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0064	<0,0001	0,0608	<0,0001	<0,0001	0,0005	<0,0001	0,0763
Pasa prueba de normalidad	No	No	No	No	No	No	Sí	No	No	No	No	Sí

Anexo 4. Estadísticos descriptivos de las variables triglicéridos, colesterol total e IMC según deficiencia, insuficiencia y suficiencia de 25-hidroxivitamina D

Cuadro 19. Estadísticos descriptivos de triglicéridos, colesterol total e IMC según el estado de 25-hidroxivitamina D, Se realizó prueba ANOVA y prueba post-hoc Tukey entre los grupos, (n=535, * indica valor de $p < 0,05$).

Variable	Estadístico descriptivo		Deficiencia n=269	Insuficiencia n=156	Suficiencia n=127
Triglicéridos* Son diferentes: los deficientes de los suficientes,	Media		218,0728	187,3612	178,1405
	95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	196,3030	172,1809	158,7997
		Límite superior	239,8427	202,5415	197,4813
	Mediana		183,0000	162,0000	158,0000
	Desviación estándar		135,38725	125,02587	107,45249
	Mínimo		50,00	49,00	45,00
	Máximo		997,00	1078,00	940,00
	Rango		947,00	1029,00	895,00
	Rango intercuartil		114,00	109,00	99,50
Colesterol total	Media		202,1656	203,2319	199,6033
	95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	195,2256	198,3012	191,8833
		Límite superior	209,1055	208,1626	207,3234
	Mediana		197,0000	199,0000	198,0000
	Desviación estándar		43,15962	40,60942	42,89065
	Mínimo		101,00	113,00	90,00
	Máximo		344,00	334,00	334,00
	Rango		243,00	221,00	244,00
	Rango intercuartil		62,00	51,00	53,00
IMC* Son diferentes: Todos los grupos entre ellos,	Media		30,2813	28,9977	27,2538
	95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	29,3356	28,3605	26,4903
		Límite superior	31,2270	29,6348	28,0172
	Mediana		29,6485	28,0600	26,8453
	Desviación estándar		5,88130	5,24762	4,24134
	Mínimo		18,97	17,69	14,57
	Máximo		51,07	47,87	41,22
	Rango		32,10	30,18	26,65
	Rango intercuartil		7,69	6,62	4,56

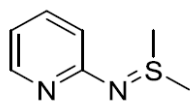
Anexo 5. Estadísticos descriptivos de las variables no alélicas ni genómicas de los controles y los casos

Cuadro 20. Frecuencia (n), ** promedio \pm desviación estándar, *mediana y rango intercuartil de las características sexo, edad, IMC, glicemia, HbA1C, perfil lipídico, personas sin y con HTA, niveles plasmáticos de 25-hidroxivitamina D en los casos y los controles (n=578).

	Controles	Casos	Datos perdidos
Sexo femenino (n)	82	105	0
Sexo masculino (n)	180	211	0
Edad (años)*	62 (54-70)	62 (56-70)	0
IMC (kg/m²)*	26,61 (24,10-29,12)	29,65 (26,61-34,40)	17
Glicemia (mg/dL)*	92 (88-96)	130 (112-161)	0
HbA1C (%)*	5,62 (5,40-5,90)	7,10 (6,20-8,40)	5
Colesterol total (mg/dL)*	208,00 (118,00-237,50)	192,00 (166,00-222,00)	1
Triglicéridos (mg/dL)*	164,00 (106,00-204,75)	181,50 (137,00-248,00)	2
HDL (mg/dL)*	43,00 (36,30-50,00)	36,65 (32,02-43,37)	3
LDL (mg/dL)**	134,40 \pm 36,60	115,40 \pm 11,95	28
VLDL (mg/dL)*	32 (21,00-40,00)	34,70 (26,85-45,95)	29
Sin HTA (n)	117	40	13
Con HTA (n)	133	275	
PAS (mmHg)*	126 (117-138)	136 (123-150)	19
PAD (mmHg)*	73 (67-79)	77 (70-83)	19
25-hidroxivitamina D (ng/mL)**	25,98 \pm 7,51	23,22 \pm 8,05	64

Anexo 6. Síntesis de 2-nitrosopiridina – necesario para la preparación de las muestras y la medición de vitamina D según el protocolo de Wan *et al* (136)

1,1-dimethyl-N-(pyridin-2-yl)-λ⁴-sulfanimine.



A – Síntesis de 1,1-dimethyl-N-(pyridin-2-yl)-λ⁴-sulfanimine

Reactivos necesarios:

- Agua (50 mL).
- Sulfato de magnesio.
- 2-aminopiridina (3,95, 42 mmol, 1 equivalente).
- N-clorosuccinimida (5,8 g, 42 mmol, 1 equivalente).
- Diclorometano CH₂Cl₂ (40 mL + 100 mL + 2x30 mL).
- Metóxido de sodio en metanol (4 M, 18 mL, 71 mmol).
- Dimetil sulfido (3,39 mL, 46,2 mmol; 1,1 equivalente).

Equipo necesario:

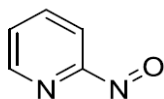
- Rotavapor.
- Cristalería.
- Agitador magnético.
- Embudo separador 200 mL.

Procedimiento:

1. Prepare un baño con hielo y NaCl que alcance la temperatura de -20°C, en el cual realice la síntesis.
2. En condiciones de -20°C, prepare una solución de 2-aminopiridina (3,95, 42 mmol, 1 equivalente) y dimetilsulfido (3,39 mL, 46,2 mmol; 1,1 equivalente) en 40 mL de CH₂Cl₂.
3. Además prepare una solución de N-clorosuccinimida (5,8 g, 42 mmol, 1 equivalente) en 100 mL de CH₂Cl₂.
4. En condiciones de -20°C agregue la solución del punto 3 a la solución de punto 2.
5. Mantenga la mezcla durante 1 hora a -20°C y luego por 1 hora a temperatura ambiente.
6. A temperatura ambiente, agregue 18 mL de una solución de metóxido de sodio 4 M (18 mL, 71 mmol [4,16 g]) a la solución del punto 4, agite por 10 minutos. Luego agregue 50 mL de agua y agite por 1 hora.
7. Separe la fase orgánica de la fase acuosa con 30 mL de CH₂Cl₂, con un embudo separador. Repita este paso.
8. Coloque la fase orgánica en MgSO₄ y deje secar. Filtre y evapore.
9. Se obtiene un polvo amarillo claro que es 1,1-dimethyl-N-(pyridin-2-yl)- λ⁴-sulfanimine (6.12 g, 95 %).

Síntesis de 2 – nitrosopiridina

2-nitrosopyridine.



Materialos necesarios:

- Sulfato de magnesio.
- CH_2Cl_2 (150 + 2 X20, 30 mL).
- NaHCO_3 solución saturada (1L de agua + 85 g de NaHCO_3).
- Metacloroperbenzoico (6.97 g, 28.3 mmol, 1.7 equivalentes).
- 1,1-dimethyl-N-(pyridin-2-yl)-l4-sulfanimine (2.56 g, 16.6 mmol), sintetizado previamente.

Equipo necesario:

10. Rotavapor.
11. Agitador magnético.
12. Embudo separador 100 y 200 mL.

Procedimiento:

- Prepare un baño con hielo que se encuentre a 0°C .
- Prepare una solución de metacloroperbenzoico (6,97 g, 28,3 mmol, 1,7 equivalentes) en 150 mL de CH_2Cl_2 , mantenga a 0°C .
- Prepare 1,1-dimethyl-N-(pyridin-2-yl)-l4-sulfanimina (2,56 g, 16,6 mmol) en 30 mL CH_2Cl_2 , mantenga a 0°C .
- Agregue a la solución del paso 3 a la solución del paso 2.
- Deje en agitación la mezcla por 90 min a 0°C , en un baño con hielo.
- Detenga la reacción con solución saturada acuosa de NaHCO_3 .
- Con un embudo separador, separe la fase orgánica de la fase acuosa con 20 mL de CH_2Cl_2 .
- Coloque la fase orgánica en MgSO_4 y deje secar. Filtre y evapore.
- Recrystalice el residuo 3 veces desde etanol para dar 2-nitrosopiridina (0.604 g, 34 %) como un residuo amarillo (punto de fundición = 114°C). La recrystalización se realiza disolviendo el producto en la menor cantidad de etanol posible, deje evaporar.

LC-MS

Materiales necesarios

- Solución interna.
- 2-nitrosopiridina.
- Solución estándar.
- Solución 0,4 M K_2HPO_4 .
- Hexano, calidad LC/MS.
- Metanol, calidad LC/MS.
- Acetonitrilo, calidad LC/MS.
- Cartuchos Oasis HLB.
- Verex™ Cert+MSQ Vial Kit, 9mm, 2mL Screw top, Clear 33 w/ Patch + MSQ PTFE/Silicone Cap, blue, 1000/Pk. Marca Phenómenex. Código del artículo AR0-992A-13-M.

Equipo necesario:

- Vórtex.
- Rotavapor.
- Centrífuga.
- LC/MS SYNAPT.
- Software Masslink.

Preparación de las muestras:

- **Solución estándar:** 50 uL de solución estándar stock + 10 uL de solución estándar interna, mezclar y dejar incubar por 30 min.
- **Plasma:** 100 uL de plasma + 10 uL de solución estándar interna, mezclar y dejar incubar por 30 min.
- Realizar 2 veces extracción con fase líquida y 1 vez extracción con fase sólida.
- Extracción con fase líquida: la primera extracción con metanol tiene como objetivo la precipitación de proteínas. La segunda extracción con hexano pretende que en la fase acuosa permanezcan 1 α - 25 hidroxivitamina D y 24R,25 hidroxivitamina D3, en la fase de hexano se encuentra 25 hidroxivitamina D.

Extracción de fase líquida

1. Añadir a las muestras de plasma 600 uL de una solución metanol/acetonitrilo (80/20). Mezclar con un Vórtex. Luego centrifugar a 20000xg por 10 min.
2. Transferir el sobrenadante de la separación de proteínas a un tubo de 2 mL de la microcentrifuga.
3. Añadir 600 uL de 0,4 M de K_2HPO_4 .
4. Añadir 600 uL de hexano para la segunda extracción de fase líquida. Mezclar durante 5 min y centrifugar por 5 min a 20000xg.
5. La fase acuosa que resulta del punto 4, debe procesarla con la extracción de fase sólida. En esta se encuentra 1 alfa, 25 hidroxivitamina D y 24R,25 hidroxivitamina D3.
6. La fase de hexano contiene a 25-hidroxivitamina D. Evapore en un rotavapor.
7. Las 2 muestras secas son derivadas con PyrNO y analizadas por separado.

Extracción de fase sólida, para la lámina acuosa:

1. *Oasis HLB* cartuchos deben ser preconditionados con metanol (2×2 mL) y metanol/agua 5% v/v (2×2 mL) en este orden.
2. Cargar los cartuchos con la fase acuosa (~ 1.3 mL) resultante de la extracción de fase líquida.
3. Seguidamente, lavar los cartuchos con metanol/agua 5% v/v (2×2 mL) y metanol/agua 100% (2 mL), con lo cual se remueve la matriz y los metabolitos de la vitamina D pueden ser reservados en los cartuchos.
4. Extraer la solución acuosa residual de los cartuchos y dejar secar al vacío por 10 min.
5. Al final, todos los metabolitos de vitamina D que queden en los cartuchos son removidos en 2 mL de tubos de microcentrífuga con 1,8 mL de acetonitrilo. Secar con rotavapor.

Derivatización:

1. Añadir 2 nitroso piridina en metanol (2,5 mM, 40 μ L), redissolver y secar las muestras.
2. Transferir las muestras en viales de vidrio ámbar y colocar en el baño de arena a 70 °C por 1 h para completar la derivatización.
3. Mezclar estas muestras con CUDA (meta-cloro-per-benzoico, 10 μ L 200 nM), transferir a un vial de HPLC con 100 μ L volumen inserto. Almacenar a -20 °C hasta análisis.
4. CUDA fue añadido para cuantificar la variabilidad del instrumento.

LC/MS

- La separación de los metabolitos de vitamina D se realiza en un equipo Waters SYNAPT.
- Las muestras se pueden mantener a 4°C, se inyectan 10 μ L de las muestras en la columna.
- Se emplea la columna C18 que se mantiene a 50°C.
- Fase móvil A: agua con 0,1% ácido fórmico.
- Fase móvil B: acetonitrilo con 0,1% de ácido fórmico.
- El gradiente de separación se muestra en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Gradiente de separación de los metabolitos de vitamina D en HPLC

Tiempo total (min)	Flujo (μ L/min)	Fase B (%)
0,00	250	40
0,50	250	40
1,00	250	65
5,00	250	72
8,00	250	82
8,10	250	100
10,40	250	100
10,50	250	40
13,00	250	40

Anexo 7. Mediciones repetidas de 25-hidroxivitamina D

Cuadro 21. Concentración de 25-hidroxivitamina D (ng/mL) de tres muestras de plasma luego de descongelarse por primera vez desde -80 °C (medición 1) y luego de descongelarse por segunda vez desde -80 °C 6 meses después de la medición 1 (medición 2).

ID muestra	Medición 1 (ng/mL)	Medición 2 (ng/mL)	Diferencia absoluta (ng/mL)
139	17,4	17,30	0,10
181	24,6	21,00	3,60
297	19,1	19,50	0,40

Anexo 8. Comandos empleados en PLINK 1.9

Cuadro 22. Líneas ingresadas en el programa PLINK 1.9 para generar los datos mostrados en los cuadros de resultados

Cuadro referido en el texto	Comando empleado en PLINK 1.9
Cuadro 9	plink --bfile snps-merge-tesis1 --pheno fenotipo-name.pheno --pheno-name Caso-control --freqx
Cuadro 10	plink --bfile snps-merge-tesis1 --pheno fenotipo-name.pheno --pheno-name Caso-control --freq case-control
Cuadro 11	plink --bfile snps-merge-tesis1 --pheno fenotipo-name.pheno --pheno-name Caso-control --hardy
Cuadro 12	plink --bfile snps-merge-tesis1 --pheno fenotipo_nameporfa.pheno --pheno-name 25OHVitD --covar Covariables-tesis2.covar keep-pheno-on-missing-cov --covar-name Status_glicémico,SEXO,Edad,IMC,HTA,COL,EV1,EV2,EV3,EV4 --geno 0,15 --mind 0,15 --maf 0,05 --assoc --qt-means --ci 0,95 --adjust --out STATUS12prueba1
Cuadro 13	plink --bfile snps-merge-tesis1 --pheno fenotipo_nameporfa.pheno --pheno-name 25OHVitD --covar Covariables-tesis2.covar keep-pheno-on-missing-cov --covar-name Status_glicémico, SEXO,Edad,IMC,COL,TRIG,HDL,LDL,VLDL,HTA,EV1-EV4 --geno 0,15 --mind 0,15 --maf 0,05 --linear --ci 0,95 --adjust --out Modelo-prueba
No contiene un cuadro	plink --bfile snps-merge-tesis1 --pheno fenotipo_nameporfa.pheno --pheno-name 25OHVitD --covar Covariables3.txt keep-pheno-on-missing-cov --covar-name Status_glicémico, SEXO,Edad,IMC,COL,TRIG,HDL,LDL,VLDL,HTA,EV1-EV4 --linear genotypic --adjust --out Modelo-vitD-genotipo. CÓDIGO NO HA FUNCIONADO.
Cuadro 14	plink --bfile snps-merge-tesis1 --pheno fenotipo-name.pheno --pheno-name Caso-control --covar Covariables-tesis2.covar keep-pheno-on-missing-cov --covar-name SEXO,Edad,IMC,COL,TRIG,HDL,LDL,VLDL,HTA,25OHVitD,EV1-EV4 --geno 0,15 --mind 0,15 --maf 0,05 --logistic --ci 0,95 --adjust --out modelo-tesis1
Cuadro 15	plink --bfile snps-merge-tesis1 --pheno fenotipo-name.pheno --pheno-name Caso-control --covar Covariables-tesis2.covar keep-pheno-on-missing-cov --covar-name SEXO,Edad,IMC,COL,TRIG,HDL,LDL,VLDL,HTA,25OHVitD,EV1-EV4 --geno 0,15 --mind 0,15 --maf 0,05 --logistic genotypic --ci 0,95 --adjust --out genotipo1
Cuadro 16	plink --bfile snps-merge-tesis1 --pheno fenotipo-name.pheno --pheno-name Caso-control --covar Covariables-tesis-sinvaciasVitDIMC.covar keep-pheno-on-missing-cov --covar-name SEXO,Edad,IMC,LDL,HTA,25OHVitD,EV1-EV10 --epistasis --adjust --out STATUSepistasis
Cuadro 17	plink --bfile snps-merge-tesis1 --pheno fenotipo-name.pheno --pheno-name Caso-control --geno 0.15 --mind 0.15 --maf 0.05 --ld-snp rs10741657,rs3755967,rs3794060,rs3829251,rs4944957,rs12800438,rs7944926,rs4588,rs7041 --r2 --out LD1

